

Versuche zur Identifizierung Phagen-codierter Proteine
des Salmonella-Phagen P22 und Untersuchungen über deren
Bindungsfähigkeit an Salmonella- und Phagen-DNS

Ursula Stauder

1980

Versuche zur Identifizierung Phagen-codierter Proteine
des Salmonella-Phagen P22 und Untersuchungen über deren
Bindungsfähigkeit an Salmonella- und Phagen-DNS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Ursula Stauder
aus Litzmannstadt

München 1980

Diese Arbeit wurde am Genetischen Institut der Universität München in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Schmieger von November 1974 bis Februar 1979 durchgeführt.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger
2. Berichterstatter: Dr. K. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 4. August 1980



1. Inhalt	1
2. Zusammenfassung - allgemeine Begriffe	2
3. Der Zusammenfassungstyp	3
4. Form und Aufbau	4
5. Zusammenfassungstypen	5
6. Aufbau der Zusammenfassung	6
7. Aufbau	7
8. Aufbau	8
9. Aufbau	9
10. Aufbau	10
11. Aufbau	11
12. Aufbau	12
13. Aufbau	13
14. Aufbau	14
15. Aufbau	15
16. Aufbau	16
17. Aufbau	17
18. Aufbau	18
19. Aufbau	19
20. Aufbau	20
21. Aufbau	21
22. Aufbau	22
23. Aufbau	23
24. Aufbau	24
25. Aufbau	25
26. Aufbau	26
27. Aufbau	27
28. Aufbau	28
29. Aufbau	29
30. Aufbau	30
31. Aufbau	31
32. Aufbau	32
33. Aufbau	33
34. Aufbau	34
35. Aufbau	35
36. Aufbau	36
37. Aufbau	37
38. Aufbau	38
39. Aufbau	39
40. Aufbau	40
41. Aufbau	41
42. Aufbau	42
43. Aufbau	43
44. Aufbau	44
45. Aufbau	45
46. Aufbau	46
47. Aufbau	47
48. Aufbau	48
49. Aufbau	49
50. Aufbau	50
51. Aufbau	51
52. Aufbau	52
53. Aufbau	53
54. Aufbau	54
55. Aufbau	55
56. Aufbau	56
57. Aufbau	57
58. Aufbau	58
59. Aufbau	59
60. Aufbau	60
61. Aufbau	61
62. Aufbau	62
63. Aufbau	63
64. Aufbau	64
65. Aufbau	65
66. Aufbau	66
67. Aufbau	67
68. Aufbau	68
69. Aufbau	69
70. Aufbau	70
71. Aufbau	71
72. Aufbau	72
73. Aufbau	73
74. Aufbau	74
75. Aufbau	75
76. Aufbau	76
77. Aufbau	77
78. Aufbau	78
79. Aufbau	79
80. Aufbau	80
81. Aufbau	81
82. Aufbau	82
83. Aufbau	83
84. Aufbau	84
85. Aufbau	85
86. Aufbau	86
87. Aufbau	87
88. Aufbau	88
89. Aufbau	89
90. Aufbau	90
91. Aufbau	91
92. Aufbau	92
93. Aufbau	93
94. Aufbau	94
95. Aufbau	95
96. Aufbau	96
97. Aufbau	97
98. Aufbau	98
99. Aufbau	99
100. Aufbau	100

Herrn Prof. Dr. H. Schmieger danke ich für die Überlassung des Themas zu dieser Arbeit.

1. Zusammenfassung	1
2. Zusammenfassung	2
3. Zusammenfassung	3
4. Zusammenfassung	4
5. Zusammenfassung	5
6. Zusammenfassung	6
7. Zusammenfassung	7
8. Zusammenfassung	8
9. Zusammenfassung	9
10. Zusammenfassung	10
11. Zusammenfassung	11
12. Zusammenfassung	12
13. Zusammenfassung	13
14. Zusammenfassung	14
15. Zusammenfassung	15
16. Zusammenfassung	16
17. Zusammenfassung	17
18. Zusammenfassung	18
19. Zusammenfassung	19
20. Zusammenfassung	20
21. Zusammenfassung	21
22. Zusammenfassung	22
23. Zusammenfassung	23
24. Zusammenfassung	24
25. Zusammenfassung	25
26. Zusammenfassung	26
27. Zusammenfassung	27
28. Zusammenfassung	28
29. Zusammenfassung	29
30. Zusammenfassung	30
31. Zusammenfassung	31
32. Zusammenfassung	32
33. Zusammenfassung	33
34. Zusammenfassung	34
35. Zusammenfassung	35
36. Zusammenfassung	36
37. Zusammenfassung	37
38. Zusammenfassung	38
39. Zusammenfassung	39
40. Zusammenfassung	40
41. Zusammenfassung	41
42. Zusammenfassung	42
43. Zusammenfassung	43
44. Zusammenfassung	44
45. Zusammenfassung	45
46. Zusammenfassung	46
47. Zusammenfassung	47
48. Zusammenfassung	48
49. Zusammenfassung	49
50. Zusammenfassung	50
51. Zusammenfassung	51
52. Zusammenfassung	52
53. Zusammenfassung	53
54. Zusammenfassung	54
55. Zusammenfassung	55
56. Zusammenfassung	56
57. Zusammenfassung	57
58. Zusammenfassung	58
59. Zusammenfassung	59
60. Zusammenfassung	60
61. Zusammenfassung	61
62. Zusammenfassung	62
63. Zusammenfassung	63
64. Zusammenfassung	64
65. Zusammenfassung	65
66. Zusammenfassung	66
67. Zusammenfassung	67
68. Zusammenfassung	68
69. Zusammenfassung	69
70. Zusammenfassung	70
71. Zusammenfassung	71
72. Zusammenfassung	72
73. Zusammenfassung	73
74. Zusammenfassung	74
75. Zusammenfassung	75
76. Zusammenfassung	76
77. Zusammenfassung	77
78. Zusammenfassung	78
79. Zusammenfassung	79
80. Zusammenfassung	80
81. Zusammenfassung	81
82. Zusammenfassung	82
83. Zusammenfassung	83
84. Zusammenfassung	84
85. Zusammenfassung	85
86. Zusammenfassung	86
87. Zusammenfassung	87
88. Zusammenfassung	88
89. Zusammenfassung	89
90. Zusammenfassung	90
91. Zusammenfassung	91
92. Zusammenfassung	92
93. Zusammenfassung	93
94. Zusammenfassung	94
95. Zusammenfassung	95
96. Zusammenfassung	96
97. Zusammenfassung	97
98. Zusammenfassung	98
99. Zusammenfassung	99
100. Zusammenfassung	100



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551903_0054

A) EINLEITUNG	7
1. Bakteriophagen - allgemeine Definition	7
2. Der Salmonella-Phage P22	8
3. Gene und Genprodukte	9
4. DNS-bindende Proteine	10
B) MATERIAL UND METHODEN	12
1. Bakterien	12
2. Phagen	13
3. Medien und Puffer	14
4. Chemikalien	17
5. Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) und Studier (1973)	17
6. Wachstumsbedingungen für Bakterien	18
7. Gewinnung eines Phagenlysates in Flüssigmedium und Titerbestimmung	18
8. Gewinnung eines Phagenlysates auf NA-Platten (=Plattenlysat)	19
9. Konzentrieren eines Phagenlysates über eine CELLEX-E-Säule	19
10. Reinigung eines Phagenlysates über einen CsCl-Stufengradienten	19
11. Phenolextraktion der Phagen-DNS	20
12. Gewinnung bakterieller DNS und RNase-Rehandlung	20
13. Transduktion und Berechnung des T/P-Wertes	21
14. Kreuzungen verschiedener Phagenmutanten	21
15. Bestimmung des Mutationsortes in der c-Region des Phagen P22 durch Komplementation	22
16. Radioaktivitätsmessungen	22
17. Proteinbestimmung	23
18. Herstellung von Proteinextrakten mit ¹⁴ C-markierten Aminosäuren zur Autoradiographie	23

19.	Herstellung von Proteinextrakten mit ^{14}C -markierten Aminosäuren zur Filterbindung	24
20.	Sucrosegradienten	25
21.	Gelfiltration auf Sephadex G 100	25
22.	Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	26
C)	ERGEBNISSE	27
1.	Problemstellung und Erarbeitung verwendbarer Methoden	27
1.1	Wachstumsbedingungen für den Bakterienstamm 4010	27
1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
1.3	Methode der Geltrocknung	33
1.4	Methode zum schnellen Aufspüren geringer Mengen an Radioaktivität in Polyacrylamid-Gelen durch Szintillations-Autoradiographie	35
2.	Identifizierung von Proteinen	36
2.1	Festimmung der Molekulargewichte der Genprodukte	36
2.2	Identifizierung der Genprodukte des Phagen P22 mit Hilfe von am-Mutanten	39
2.3	Zugeordnete Banden der SDS-Polyacrylamid-Gele	40
2.4	Versuch zur Identifizierung von Genprodukt 19	47
2.5	Veränderungen des Bandenmusters bei den Transduktionsmutanten	48
2.6	Kreuzungen von Rekombinanten zwischen der Transduktionsmutante HT 12/4 und DF-Stämmen	51
3.	Versuch zur Identifizierung des DNS-Protein-Komplexes über Sucrosegradienten	56
4.	Trennung von Proteinmischungen über Filterbindung	61
4.1	Methode der Filterbindung - allgemein	61
4.2	Trennung der Proteinmischung über Filterbindung	65
4.2.1	Herstellung von Extrakten Phagen-infizierter Zellen	67

4.2.2	Untersuchungen über die Bindungsfähigkeit der Zellextrakte A und P bei Anwendung unterschiedlicher Bindungsmethoden	67
4.2.3	Versuch der Identifizierung der Proteine, die an DNS binden	69
4.3	Methode der SDS-freien Polyacrylamid-Gele	72
4.3.1	Trennung der Proteinextrakte über SDS-freie Polyacrylamid-Gele	73
4.3.2	Zuordnung der zu erkennenden Banden zu Proteinen aufgrund der Wanderungsstrecke der Proteine	74
4.4	Trennung von Proteinextrakten über Sucrosegradienten und Identifizierung der aufgetrennten Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gele und Autoradiographie	77
4.5	Identifizierung der Proteinmischung über eine Sephadex G-100 Säule	80
4.5.1	Filterbindungstests der einzelnen Fraktionen der Sephadex G-100 Säule	80
4.5.2	Identifizierung der Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gele und nachfolgende Autoradiographie	82
4.6	Trennung der Proteinlösung über den Anionenaustauscher DEAE-Zellulose	83
4.6.1	Filterbindungstest der einzelnen Fraktionen der Flution vom Anionenaustauscher DEAE-Zellulose	84
4.6.2	Identifizierung der Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gele und nachfolgende Autoradiographie	86
D)	DISKUSSION	88
E)	ZUSAMMENFASSUNG	97
F)	LITERATURVERZEICHNIS	99

A) EINLEITUNG

=====

1. Bakteriophagen - allgemeine Definition

Bakteriophagen sind Bakterienviren und wie andere Viren auf den Stoffwechsel ihrer Wirte angewiesen. Die Bakteriophagen, auch kurz als Phagen bezeichnet, bestehen nur aus genetischem Material (DNS oder RNS), das von einer mehr oder weniger komplizierten Proteinhülle umgeben ist. Die Phagen werden aufgrund ihres Vermehrungszyklus in zwei Gruppen unterteilt, nämlich die virulenten und die temperenten Phagen.

Zu den >virulenten Phagen< werden z.B. die geradzahligten T-Phagen des Bakteriums *Escherichia coli* gezählt. Diese Phagen adsorbieren an die für sie spezifischen Rezeptorstellen in der Oberfläche der Bakterienzellwand. Sodann injizieren sie ihr genetisches Material in die Wirtszelle. Dieser Vorgang wird als Phageninfektion bezeichnet. Nach der Phageninfektion beginnt in der Zelle sofort die Replikation der Phagen. Nach ca. 20 bis 40 min wird die neue Phagengeneration durch das Lysieren der Wirtszelle freigesetzt. Jede Wirtszelle kann einige hundert Phagen produzieren. Im Normalfall wird bei der Vermehrung der virulenten Phagen das Chromosom des Wirtsbakteriums bis zu Mononukleotiden abgebaut.

Die >temperenten Phagen< haben nach Phageninfektion zwei Möglichkeiten. Sie können entweder wie die virulenten Phagen in den lytischen Zyklus eintreten und die Phagenreplikation in Gang setzen, oder aber sie führen zur Lysogenie des Wirtes, indem das Phagengenom entweder in das Wirtschromosom als Prophage eingebaut wird, wie dies bei dem *Salmonella*-Phagen P22 und dem *E. coli*-Phagen Lambda der Fall ist, oder die Phagen-DNS liegt als selbständig replizierende Ringstruktur im Wirt vor, wie beim *E. coli*-Phagen P1. Die Prophagen können über Generationen mit dem Wirtsgenom repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben werden. Erst auf einen bisher noch unbekannten Reiz hin kann es geschehen, daß der Prophage aus dem Bakteriengenom ausscheidet und in den lytischen Zyklus übergeht, was eine Phagenvermehrung und den Tod der Wirtszelle zur Folge hat.

Diese Induktion des Prophagen kann auch experimentell durch Bestrahlung mit UV-Licht oder auch durch Behandlung mit mutagenen Substanzen ausgelöst werden.

2. Der Salmonella-Phage P22

Der Salmonella-Phage P22 gehört, wie schon erwähnt, zu den temperenten Phagen. Jedes Phagenpartikel hat ein doppelsträngiges DNS-Molekül mit einem Molekulargewicht von 27 bis 28 x 10⁶ d verpackt (Rhoades et al., 1968; Tye et al., 1974; Susskind u. Botstein, 1978; Jackson et al., 1978). Dieses DNS-Molekül besitzt eine geringfügig andere Dichte als das Wirtschromosom (LT-2) (Smith, 1968). Das DNS-Molekül des Phagen P22 ist sowohl terminal redundant (Rhoades et al., 1968), als auch zirkulär permutiert (Tye et al., 1974). Der Phage ist in der Lage, genetisches Material von einem Spenderbakterium auf einen Empfänger zu übertragen, indem er bei der Phagenvermehrung statt Phagen-eigener DNS einen Teil der DNS des Wirtsbakteriums verpackt. Dieser Vorgang der Übertragung genetischen Materials von einem Spender auf einen Empfänger wird als Transduktion bezeichnet und wurde zuerst von Zinder und Lederberg (1952) am System *Salmonella typhimurium*/Phage P22 beobachtet.

Bei dem Salmonella-Phagen P22 wurden Mutanten entdeckt, die in erhöhtem Maße bakterielle DNS verpacken können. Diese Phagenmutanten werden als HT-Mutanten bezeichnet. Schmieger (1972) hat festgestellt, daß nach Infektion mit der P22-Mutante H5, die in bezug auf die Übertragung genetischen Materials Wildtypeeigenschaft aufweist, nur etwa 0,7 bis 1 % der DNS aller infizierten Bakterien in transduzierende Partikel (t.P.) verpackt wird.

Die von Schmieger (1972) isolierten HT-Phagen hingegen können insgesamt bis zu 20mal mehr t.P. bilden als der Wildtyp bzw. H5.

Für die Verpackung sowohl der eigenen DNS zu infektiösen Partikeln (i.P.) als auch der Wirts-DNS zu transduzierenden Partikeln (t.P.) wird das Modell von Streisinger und Mitarbeitern (1967) favorisiert, welches die DNS-Verpackung nach dem "headful"-Mechanismus fordert, d.h. die Phagen-DNS wird aus DNS-Konkatemeren geschnitten, die mehrfache Phagengenomlänge besitzen. Die Bildung dieser DNS-Konkatemere kann durch das Modell des "rolling circle" von Gilbert und Dressler (1968) erklärt werden. Tye et al., (1974) verlangen für die Verpackung der DNS zu i.P. einen Initiationsort auf den DNS-Konkatemeren für die erste Verpackung. Die DNS-Verpackung der weiteren Partikel schreitet dann sequentiell in einer Richtung fort. Die DNS in transduzierenden Phagen besteht vorwiegend aus Material, das vor Phageninfektion in der Bakterienzelle synthetisiert wurde (Starlinger, 1959; Schmieger, 1968). Es konnte nachgewiesen werden (Schmieger, 1971; Schmieger u. Buch, 1975), daß die bakterielle DNS nach Phageninfektion im System *Salmonella typhimurium*/Phage P22 nicht in Nukleotide abgebaut wird, wie dies in der mit dem Phagen T4 infizierten *E. coli*-Zelle von Hershey und Mitarbeitern (1953)

nachgewiesen werden konnte. Von Schmieger und Fuch (1975) konnte gezeigt werden, daß nach Infektion mit Transduktionsmutanten (HT) des Phagen P22 die bakteriellen DNS-Fragmente direkt von ca. 10-facher Phagen-DNS-Genomlänge auf die Länge eines Phagen-genoms geschnitten wurde. Desweiteren sind Untersuchungen im Gange (Strobel u. Schmieger, 1979), die zeigen, daß DNS vom Phagen P22 nur dann verpackt wird, wenn die zu verpackende DNS in einem größeren Stück vorliegt als der reifen Phagen-DNS entspricht.

3. Gene und Genprodukte

Zum besseren Verständnis z.B. dieser DNS-Verpackungs-Vorgänge ist es vorteilhaft, wenn man solche Reaktionen auf molekularer Ebene in vitro nachvollziehen kann. Eines der "einfachsten" biologischen Systeme ist das der Bakteriophagen, da diese nur aus genetischem Material und einer Proteinhülle bestehen. Defekte, die in einem solchen System vorhanden sind, treten sofort phänotypisch in Erscheinung, entweder durch das Fehlen bestimmter Proteine oder durch Veränderungen derselben. Die Identifizierung solcher Proteine mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelen ist unter anderem von Laemmli (1970), Esche et al. (1975) und Yates und Mitarbeitern (1977) durchgeführt worden.

Vom Phagen P22 wurden bisher 29 Gene kartiert (Lew u. Casjens, 1975; Susskind u. Botstein, 1978). Die Funktion ihrer Genprodukte kann bestimmten Reifungsschritten zugeordnet werden und die Molekulargewichte von 19 verschiedenen Proteinen konnten mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt werden. Die Kenntnis über die Funktion der Genprodukte wurde durch die Benutzung von am- und ts-Mutanten erhalten. Diese Mutanten können in Suppressor-negativen Stämmen bzw. bei nicht permissiver Temperatur die entsprechenden Proteine nicht oder nur defekt synthetisieren.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß z.B. das Genprodukt 8 (das Scaffolding Protein) notwendig ist, um die Kondensation des Phagen-Kopf-Precursor's zu ermöglichen. Pro Phagenkopf werden 250 Moleküle des Genproduktes 8 benötigt, die aber den Phagenkopf wieder verlassen, und zwar ohne proteolytisch gespalten zu werden, und zur Kondensation neuer Phagenköpfe herangezogen werden (Casjens u. King, 1974). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß zur Bildung infektiöser Phagenpartikel die Genprodukte von 10 späten Genen notwendig sind (Botstein, Waddell, King, 1973).

King, Lenk u. Botstein (1973) haben gezeigt, welche Genprodukte zu welchem Zeitpunkt der Phagenreifung anwesend sein müssen, um den Phagenkopf zu bilden und mit DNS zu füllen. Sie haben sozusagen den Zeitplan des Phagenreifungs-

prozesses aufgestellt.

4. DNS-bindende Proteine

Wie für alle biologischen Systeme werden auch für die Phagenreifung DNS-bindende Proteine erwartet. Es sind weder Transkription noch Replikation der genetischen Information oder Reparaturmechanismen an der DNS denkbar ohne die Mitwirkung solcher Proteine. Jedoch ist die Spezifität dieser Proteine nicht immer gleich.

Auch die DNS-Polymerasen der Eukaryonten binden an die DNS und sind inzwischen bei den verschiedenen Spezies nachgewiesen worden (Lewis et al., 1974; Bollum, 1975; Holmes et al., 1975; Weissbach, 1975; Joester et al., 1978).

DNS-bindende Proteine konnten ebenfalls bei den Prokaryonten nachgewiesen werden. So gehören z.B. die beiden Repressor-Proteine cI und Cro bei dem Bakteriophagen Lambda (Folkmanis et al., 1976) dazu. Brody (1973) konnte zeigen, daß bei dem Phagen Lambda das Kopfprotein E in nicht-DNS-bindender Form und in DNS-bindender Form vorliegen kann. Die nicht-DNS-bindende Form des Proteins E liegt vor im "petit Lambda" und in tubulösen Köpfen. In beiden Strukturen konnte keine DNS nachgewiesen werden.

Die DNS-bindenden Proteine werden jedoch nicht immer von dem betreffenden System in funktionsfähigem Zustand synthetisiert. Bachrach und Mitarbeiter (1974) stellten fest, daß nach der Infektion des Bakterienstammes *E. coli* B durch den Phagen T4 von diesem eine Vorläuferstruktur gebildet wird. Dieses Vorläuferprotein wird im Verlauf der Phagenreifung enzymatisch in das endgültige Protein "geschnitten". Dieses Protein bindet nach dem Schneiden spezifisch an DNS des Phagen T4. Als Bindungssubstrat wird weder DNS von *E. coli* B, noch von *Clostridium perfringens*, oder vom Bakteriophagen T2, Lambda, ΦX 174 angenommen. Obwohl dieses Protein so spezifisch an T4-DNS bindet, konnte mit dem Vorläufer dieses Proteins keine Bindungsaktivität nachgewiesen werden. Bei dem Salmonella-Phagen P22 konnte von dem Genprodukt c_2 (dem Repressor) spezifische Bindungsaktivität zu Phagen-DNS gezeigt werden (Gough et al., 1975; Schumann et al., 1976).

Beide Arbeitsgruppen fanden eine spezifische Bindungsaktivität des c_2 -Genproduktes an P22-DNS 5 bis 15 min nach Phageninfektion mit dem Phagen P22 c^+ . Schumann und Mitarbeiter beobachteten ebenfalls eine DNS-Protein-Komplexbildung der Genprodukte c_1 und c_3 in daraufhin untersuchten Proteinextrakten dieser Mutanten mit Phagen-DNS. Sie schließen daraus, daß die c_1 - und c_3 -Genprodukte zur Synthese des c_2 -Repressors notwendig sind.

Bei der Untersuchung des Proteinextraktes der Phagenmutante P22 c₃ konnte außer einer DNS-Bindungsaktivität zu einem frühen Zeitpunkt (5 bis 15 min) nach der Phageninfektion auch noch ein später Anstieg der Bindungsaktivität, bis zu 50 min nach Phageninfektion, festgestellt werden. Diese spät-auftretende Bindungsaktivität konnte nicht nach Infektion mit P22 c⁺ unter Bedingungen beobachtet werden, die vorwiegend zur Lysogenisierung führen, während Infektion mit den Klarplaquephagen zur Phagenvermehrung führt. Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß die Proteine, die für den späten Anstieg der Bindungsaktivität verantwortlich sind, im Verlauf der Phagenvermehrung benötigt werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollten nun möglichst weitere Phagen-spezifische Proteine identifiziert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Untersuchungen über die DNS-Bindungsaktivität von Proteinextrakten zu späteren Zeiten (30 bis 40 min) nach Phageninfektion vorzunehmen. Diese Versuche sollten Aufschluß darüber geben, welche Phagen-eigenen Proteine im Laufe der Phagenreifung Bindung mit Phagen-DNS bzw. Bakterien-DNS eingehen.

B) MATERIAL UND METHODEN

=====

1. Bakterien

Bezeichnung	Genotyp, Beschreibung	Herkunft
-----	-----	-----
LT-2	Wildtyp, Su ⁻	dieses Labor
Su 70	Su ⁺ , amber-Supressor, NG-induzierte Cystein-amber- Mutante des LT-2	" "
T 4/2	thy ⁻ auxotroph für Thymin/Thymidin, NG-induzierte Mutante von LT-2	" "
TLara(P22)	thr 47, leu 39, ara 9 auxotroph für Threonin, Leucin, kein Arabinose-Abbau, P22-lysogen	" "
His B22(P22)	his B22 auxotroph für Histidin, P22-lysogen	" "
Trp 8(P22)	trp 8 auxotroph für Tryptophan, P22-lysogen	" "
SA 4(P22)	leu A124, ara B9 auxotroph für Leucin, kein Arabinose-Abbau, P22-lysogen	Sanderson
4010	his G46Δ(chl D-uvr B-bio-gal) auxotroph für Histidin, Biotin, kann Glukose nicht in Galaktose umbauen, UV-sensibel	B. Ames (TA 1530)
DB 122	lysogener Bakterienstamm, trägt eine Deletion, die die Prophagengene int bis 19 betrifft; siehe Abb. 15	D. Botstein
DB 5064	lysogener Bakterienstamm mit Deletion der Prophagengene 9 bis 2; siehe Abb. 15	D. Botstein

2. Phagen

Bezeichnung	Genotyp, Beschreibung	Herkunft
H5	Klarplaquemutante von P22, P22 c ₂ ⁻	dieses Labor
HT 12/4	NG-induzierte Mutante von H5 mit erhöhter Transduktionshäufigkeit, kleine Plaques	" "
HT 13/4	NG-induzierte Mutante von H5 mit erhöhter Transduktionshäufigkeit, normal große Plaques	" "
NT 1/1 c ₂ ⁻ am 13	Mutante von H5 mit verminderter Transduktionshäufigkeit und Lysisdefekt	" "
NT 6/2a c ₂ ⁻ am 13	Mutante von H5 mit verminderter Transduktionshäufigkeit und Lysisdefekt	" "
NT 12/1 c ₂ ⁻ am 13	Mutante von H5 mit verminderter Transduktionshäufigkeit und Lysisdefekt	" "
am1 am13 c ₂ ⁻	1 ⁻ am N10 13 ⁻ am c ₂ ⁻	" "
am2 am13 c ₂ ⁻	2 ⁻ am H200 13 ⁻ am c ₂ ⁻	" "
am3	3 ⁻ am N6 c ₄ ⁻	D. Botstein
am5 am13	5 ⁻ am N114 13 ⁻ am c ₁ ⁻	dieses Labor
am8 am13	8 ⁻ am H202 c ₁ ⁻ h 13 ⁻ am	" "
am9	9 ⁻ am N9 m ₃ sie 1	D. Botstein
am13	13 ⁻ am H101 c ⁺	D. Botstein
am59	16 ⁻ am H59 (Nr. 39)	Kolstad
am60	16 ⁻ am H60 (Nr. 34)	Kolstad
am62	19 ⁻ am H62(ts)	Kolstad
am13 c ₂ ⁻	13 ⁻ am H101 c ₂ ⁻	dieses Labor
am13 HT12/4 c ₂ ⁻	13 ⁻ am H101 HT12/4 c ₂ ⁻	dieses Labor

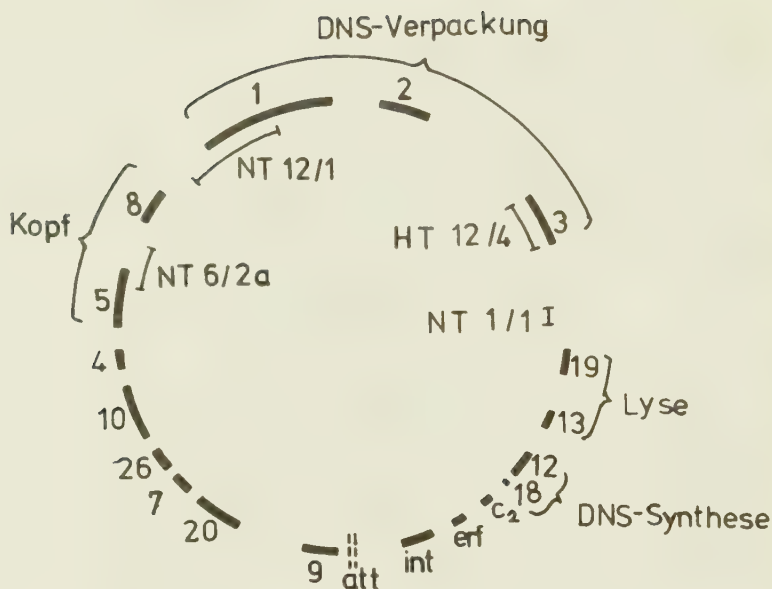


Abbildung 1: Genkarte des Phagen P22

3. Medien und Puffer

NB-Medium	8 g Bacto-Nutrient-Broth, 5 g NaCl, 1000 ml entionisiertes Wasser
NB-Platten	NB-Medium und 1,5 % Agar
Weichagar	NB-Medium und 0,7 % Agar
M9-Medium	Minimalmed. n. Smith u. Levin (1964): 7,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 3,0 g KH_2PO_4 0,5 g NaCl 1,0 g NH_4Cl mit entionisiertem Wasser auffüllen auf 1000 ml, autoklavieren. Nach dem Autoklavieren 20 ml 20%ige Glukose und 10 ml 0,1 mol/l MgSO_4 zugeben.

M9-Platten	7,5 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O 3,0 g KH_2PO_4 0,5 g NaCl 1,0 g NH_4Cl 15 g Difco-Agar 980 ml entionisiertes Wasser, auto- klavieren. Nach dem Autoklavieren Zugabe von: 10 ml Glucose-Lösung 20 % und 10 ml 0,1 mol/l MgSO_4
M9-Puffer	7,5 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O 3,0 g KH_2PO_4 5,0 g NaCl 0,25 g MgSO_4 x 7 H_2O 1000 ml entionisiertes Wasser
Saline	Verdünnungsflüssigkeit für Phagen: 1 g Trypton 10 g NaCl 1000 ml entionisiertes Wasser
1 x SSC	0,15 mol/l NaCl 0,015 mol/l Na-Citrat
1/10 SSC	Verdünnung von 1x SSC mit entionisiertem Wasser im Verhältnis 1 : 10
10 x SSC	10fach konzentriertes SSC
³ H-Markierungsmedium für Bakterien- und Phagen-DNS:	M9-Medium mit 1 µg "kaltem" Thymidin pro ml, 10 µCi ³ H-Thymidin/ml (spez. Aktivität: 5000 mCi/mmol, entspricht 0,48 µg Thymidin/ml) und 250 µg Desoxyadenosin/ml.
¹⁴ C-Markierungsmedium für Phagen-Proteine:	M9-Medium mit 1 µCi ¹⁴ C-Aminosäure- mischung/ml (spez. Aktivität: 58 mCi/mAtom Kohlenstoff).
Lysis-Puffer nach Echols und Green (1971):	10 ml 0,5 mol/l Tris-HCl pH 7,4 2 ml 0,1 mol/l Na_3EDTA 45 ml 1,0 mol/l NH_4Cl 14 g Sucrose, auffüllen auf 100 ml mit entionisiertem Wasser, filtersterilisieren.
Dialyse-Puffer nach Echols und Green (1971):	10 ml 1 mol/l Tris-HCl pH 7,4 10 ml 1 mol/l MgCl_2 10 ml 2 mol/l NH_4Cl 15 mg Dithiothreitol

auffüllen auf 1000 ml mit
entionisiertem Wasser.

Bindungspuffer nach Echols und Green (1971):

10 ml 1 mol/l Tris-HCl pH 7,4
10 ml 1 mol/l $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$
10 ml 2 mol/l KCl
2,5 ml 0,1 mol/l EDTA
auffüllen auf 1000 ml mit
entionisiertem Wasser.

Elektrophorese-Puffer nach Laemmli (1970):

0,025 mol/l Tris
0,192 mol/l Glycin
0,1 % SDS
auffüllen auf 1000 ml mit ent-
ionisiertem Wasser, der pH sollte
bei 8,4 $\pm$ 0,1 sein.

Trenngel-Stammlösung - 4 x konz. - nach Laemmli (1970):

1,5 mol/l Tris
0,4 % SDS
einstellen auf pH 8,8 mit konz. HCl,
auffüllen auf 100 ml mit entionisier-
tem Wasser.

Sammelgel-Stammlösung nach Laemmli (1970) - 4 x konz.:

0,5 mol/l Tris
0,4 % SDS
einstellen auf pH 6,8 mit konz. HCl,
auffüllen auf 100 ml mit entionisier-
tem Wasser.

Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung - 10 x konzentriert -
nach Laemmli (1970):

30 g Acrylamid
0,8 g Bisacrylamid
auffüllen mit entionisiertem Wasser
auf 100 ml.

Proben-Puffer nach Laemmli (1970):

15 % Glycerol
5 % 2-Mercaptoäthanol
2,3 % SDS
0,001 % Bromphenolblau
0,0625 mol/l Tris-HCl pH 6,8
auffüllen auf 50 ml mit entioniser-
tem Wasser.

Färbelösung:

0,25 % Coomassie Brilliant-Blue R-250
lösen in
5 vol Methanol
1 vol Essigsäure (Eisessig)
5 vol Wasser

Entfärbelösung: 7 % Essigsäure (Eisessig)
5 % Methanol in entionisiertem Wasser.

4. Chemikalien

2-Mercaptoäthanol	Serva
Lysozym	Serva
Brij 58	Serva
TEMED	Serva
Acrylamid	Serva
Bisacrylamid	Serva
Coomassie	Serva
Brilliant-Blue	
Cellex-E	Bio.Rad.Laboratories
¹⁴ C-Aminosäure- mischung	Amersham Buchler
³ H-Thymidin	Amersham Buchler
Membranfilter BA 85	Schleicher & Schüll
Filterpapier	Schleicher & Schüll
Nr. 601, 2668, 2992, 23 SL	
Dithiothreitol	Sigma
Na ₃ EDTA	Riedel-De Haen AG
Triton X-100	Koch-Light Laboratories Ltd.
SDS	Merck
Ammoniumperoxodi- sulfat	Merck
PPO	Packard
dimethyl-POPOP	Packard
Zellophanfolie (Nalophan)	Kalle
Röntgenentwickler	Agfa-Gevaert
Röntgenfixierer	Agfa-Gevaert
Röntgenfilme :	
Osray T 4	Agfa-Gevaert
Cronex II	Du Pont

5. Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) und Studier (1973)

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus Zellextrakten werden Plattengele verwendet. Diese Plattengele setzen sich aus Trenngel und Sammelgel zusammen, die sich in der Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration, in der Molarität des Tris und in den pH-Werten unterscheiden. Zur Herstellung eines 10%igen Trenngels werden 10 ml Trenngel-Stammlösung, 13,4 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, 16,6 ml dest. Wasser, 0,12 ml frisch hergestelltes 10%iges Ammoniumperoxodisulfat und 10 µl TEMED vermischt und zwischen zwei durch Abstandshalter verbundene Glasplatten

gegossen.

Nach dem Polymerisieren des Trenngeles wird das Sammelgel aus 2,5 ml Sammelgel-Stammlösung, 1 ml Acrylamid-Bis-acrylamid-Stammlösung, 6,5 ml dest. Wasser, 0,03 ml 10%igem Ammoniumperoxodisulfat und 10 μ l TEMED gemischt und auf das Trenngel gegossen.

Auf das polymerisierte Sammelgel wird die zu trennende Probe aufgetragen und bei einer Stromstärke von 30 mA getrennt. Ist die Auftrennung der Proben beendet, werden die Proteine im Gel fixiert, das Gel getrocknet und die Ergebnisse ausgewertet.

6. Wachstumsbedingungen für Bakterien

Übernachtkulturen (ÜK) werden durch Beimpfen von 5 ml NB mit 0,05 ml einer Stammkultur des jeweiligen Stammes und ca. 16stündigem Inkubieren in einem Rollbebrüter bei 37°C erhalten. Die Kultur erreicht dabei eine Dichte von ca. 2×10^9 Zellen/ml.

7. Gewinnung eines Phagenlysates in Flüssigmedium und Titerbestimmung

NB-Medium wird in der Verdünnung 1:100 aus einer ÜK mit dem entsprechenden Wirtsbakterium beimpft und bei 37°C solange belüftet, bis ein Zelltiter von 2×10^8 Zellen/ml erreicht ist. Nach Erreichen dieser Dichte wird die Bakterienkultur, die sich in der log-Phase befindet, mit Phagen infiziert, $\text{moi} = 10$ ($\text{moi} = \text{multiplicity of infection}$, d.h. auf ein Bakterium entfallen 10 Phagen). Diese hohe Multiplizität wird gewählt, um sicher zu sein, daß alle Bakterien infiziert werden. Anschließend wird bis zur Klärung der Kultur (Lyse) weiterbelüftet. Wenn sich die Kultur geklärt hat, jedoch spätestens nach zwei Stunden, wird etwas Chloroform zugegeben, um alle bis dahin noch nicht lysierten Zellen abzutöten, bzw. die Lyse zu beschleunigen. Den Phagen schadet das Chloroform nicht. Die Kultur wird solange weiterbelüftet, bis alles Chloroform wieder aus dem Lysat entfernt ist. Anschließend wird in der Minifuge zentrifugiert, damit sich die Zelltrümmer als Pellet absetzen können. Der Überstand, in dem sich die Phagen befinden, wird aufbewahrt und eine Titerbestimmung durchgeführt.

Dazu werden von einer geeigneten Verdünnung des Phagenlysates 0,1 ml zusammen mit 2 Tropfen einer ÜK als Indikator und 2,5 ml BA-Weichagar plattiert.

Wenn nicht anders erwähnt, erfolgten alle Zentrifugationen in der Minifuge bei 5.600 g und 10 min.

8. Gewinnung eines Phagenlysates auf NA-Platten (=Plattenlysat)

Von Phagenmutanten, die sich in Flüssigmedium nicht gut vermehren, werden Plattenlysate gezogen. Um ein Phagenlysat auf einer Agarplatte zu ziehen, werden in 5 ml Weichagar 0,2 ml Bakterien aus einer UK und ca. 10^5 Phagen gemischt und auf eine NA-Platte ausgegossen. Diese Platte wird 7 Stunden bei 37°C bebrütet und dann mit Chloroform bedampft, um die Zellen zu lysieren bzw. abzutöten. Der Weichagar wird mit sterilen Objektträgern von der NA-Platte abgekratzt und in einem sterilen Zentrifugenröhrchen gesammelt. Durch Zentrifugieren in der Minifuge wird der Weichagar pelletiert. Die Phagen befinden sich im Überstand. Es folgt eine Titerbestimmung.

9. Konzentrieren eines Phagenlysates über eine CELLEX-E-Säule

Eine CELLEX-E-Säule wird mit 1 mol/l NaOH-Lösung behandelt und anschließend mit entionisiertem Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Auf diese Säule wird das Phagenlysat gegeben. Die Phagen adsorbieren an die Austauscherzellulose und können anschließend mit 0,3 mol/l NaCl-Lösung eluiert werden.

10. Reinigung eines Phagenlysates über einen CsCl-Stufen- gradienten

Zur weiteren Konzentrierung und Reinigung werden die Phagen in einem CsCl-Stufengradienten zentrifugiert. Hierzu verwendet man 30 ml-Zentrifugenröhrchen aus Zellulosenitrat, in die zuerst 5 ml einer CsCl-Lösung der Dichte $1,600 \text{ g/cm}^3$ eingefüllt werden. Diese überschichtet man vorsichtig mit 7 ml einer CsCl-Lösung der Dichte $1,400 \text{ g/cm}^3$. Darüber wird das Eluat, das die Phagen enthält, geschichtet. Zum Schluß wird darüber noch flüssiges Paraffin gegeben, um zu vermeiden, daß bei nicht genügend gefüllten Zentrifugenröhrchen diese während der Zentrifugation kollabieren. Die Zentrifugation erfolgt in der Ultrazentrifuge L 2 von Beckman. Es wird der Rotor SW 25.1 benutzt und 90 min bei 5°C mit 75.000 g zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation befinden sich die Phagen in der Trennschicht zwischen den unterschiedlich dichten

CsCl-Lösungen, da sie eine Eigendichte von $1,500 \text{ g/cm}^3$ haben. Man gewinnt die Phagen, indem man den Boden des Zentrifugenröhrchens mit einer Kanüle durchsticht, diese bis unmittelbar unter die Phagenschicht führt und die Phagen in einen Dialyseschlauch abtropfen läßt. Das in dem so gewonnenen Phagenlysat enthaltene CsCl wird durch Dialyse gegen 1 Liter 1/10 SSC-Lösung entfernt.

11. Phenolextraktion der Phagen-DNS

Frisch destilliertes, flüssiges Phenol wird im Verhältnis 1:2 (v/v) mit 0,1 mol/l Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, vermischt und bei Raumtemperatur in der Minifuge bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere Phase (phenol-gesättigter Puffer) wird verworfen, die untere Phase (puffergesättigtes Phenol) im Verhältnis 1:1 (v/v) mit im CsCl-Stufengradienten gereinigtem Phagenlysat gemischt und 20 min bei Raumtemperatur in einem Schraubröhrchen langsam gerollt. Zur Phasentrennung wird das Gemisch in der Minifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase, welche die DNS enthält, wird vorsichtig abpipettiert und die Phenolbehandlung einmal wiederholt. Anschließend wird die obere DNS-haltige Phase in einen Dialyseschlauch gefüllt und zur Entfernung von Phenol 3 x 12 Stunden im Kühlraum gegen 1 Liter 1/10 SSC dialysiert.

12. Gewinnung bakterieller DNS und RNase-Behandlung

NB-Medium wird in der Verdünnung 1:100 aus einer ÜK mit LT-2 beimpft und bei 37°C solange belüftet, bis ein Zelltiter von $3 - 4 \times 10^8$ Zellen/ml erreicht ist. Die Kultur wird bei Raumtemperatur in der Minifuge zentrifugiert und das Pellet in 1/100 Volumen Tris-HCl/EDTA-Puffer, pH 7,4, aufgenommen (0,01 mol/l Tris-HCl; 0,005 mol/l EDTA). Lysozym wird bis zu einer Endkonzentration von $330 \mu\text{g/ml}$ zugegeben. Dieses Gemisch wird 10 min bei 37°C im Wasserbad belassen. Anschließend wird die Probe in ein 65°C Wasserbad gegeben, SDS bis zu einer Endkonzentration von 2% hinzupipettiert und 20 min inkubiert. Pro ml Probe werden 0,2 ml 5 mol/l NaClO_4 zugesetzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nun wird das gleiche Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24 vol + 1 vol) dazugegeben und 30 min bei 4°C geschüttelt. Danach wird in der Minifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthält die DNS, welche vorsichtig in ein Becherglas pipettiert und mit dem doppelten Volumen 96%igem Äthylalkohol versetzt wird. DNS und Äthylalkohol werden vorsichtig vermischt. Dadurch werden die DNS und RNS dehydratisiert und fallen als weißer, milchiger Niederschlag aus. Die gefällte DNS wird 30 min in der Minifuge abzentrifugiert und anschließend in 10 ml 1/10 SSC vorsichtig gelöst. Zu der gelösten DNS wird

1 ml 10 x SSC gegeben. Anschließend wird die gelöste DNS nochmals mit gleichem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und geschüttelt. Die Alkoholfällung wird wiederholt und die gelöste DNS mit RNase behandelt. Pro ml DNS-Lösung werden 100 µg RNase in 0,15 mol/l NaCl pH 5,0 gelöst und 10 min im Wasserbad auf 80°C erhitzt. Die auf 37°C abgekühlte RNase-Lösung wird der gelösten DNS zugesetzt und 30 min bei 37°C belassen. Zur Befreiung der DNS-Lösung von der RNase wird die gelöste DNS mit puffergesättigtem Phenol gerollt.

13. Transduktion und Berechnung des T/P-Wertes

Zur Transduktion wird die ÜK eines geeigneten Empfängers mit einem Phagenlysats so gemischt, daß maximal eine $moi = 10$ erreicht wird. Das Gemisch wird 10 min unbelüftet im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der 10 min wird die Infektion im Eisbad gestoppt. Das Gemisch wird unverdünnt oder in geeigneter Verdünnung auf Minimalplatten plattiert und 2 Tage bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit können die Kolonien ausgezählt werden, die durch rekombinative Transduktion entstanden sind.

Der T/P-Wert als Maß für die Transduktionshäufigkeit wird bestimmt als Verhältnis der rekombinativen Transduktanten zu den infizierenden Partikeln.

14. Kreuzungen verschiedener Phagenmutanten

Zur Einführung der am 13-Mutation in die NT- und HT-Phagenmutanten werden Kreuzungen zwischen diesen Mutanten durchgeführt und die Rekombinanten auf ihre Eigenschaften überprüft. Eine Bakterienkultur mit der Dichte 2×10^8 Zellen/ml wird sowohl mit der am-Mutante als auch mit der Transduktionsmutante infiziert. Die moi beträgt in beiden Fällen 10. Die infizierte Bakterienkultur wird 90 min bei 37°C belüftet, mit Chloroform behandelt und schließlich in der Minifuge zentrifugiert. Der Titer wird bestimmt (Su^+ als Indikator) und anschließend werden die Phagen in geeigneter Verdünnung auf dem Stamm $Su 70$, der Suppressor-positiv ist, plattiert. Zur Überprüfung der am-Eigenschaft werden die Einzelplaques mit sterilen Holzstäbchen auf M9-Platten ($Su 70$ als Indikatorbakterium) und NA-Platten (LT-2 als Indikatorbakterium) überimpft. Die Platten werden über Nacht bei 37°C bebrütet. Die am-Mutanten werden auf der M9-Platte markiert und diese anschließend mit Chloroform bedampft, um die Indikatorbakterien abzutöten. Das Chloroform wird durch das Auslüften der Platten entfernt und zur Überprüfung der Transduktionseigenschaften der Mutanten wird die Bakterienmutante His B22(P22) auf die M9-Platte aufgesprüht. Je nach Transduktionseigenschaft der Mutante sind in dem Plaqueareal

entweder wenige (NT) oder relativ viele (HT) Bakterienkolonien zu finden im Vergleich zu dem Phagenwildtyp.

15. Bestimmung des Mutationsortes in der c-Region des Phagen P22 durch Komplementation

Der Phage P22 besitzt drei verschiedene c-Gene (c_1 , c_2 und c_3), die dicht beieinander liegen und die sogenannte Immunitätsregion (c-Region) bilden. Das c_2 -Genprodukt ist das Repressorprotein, es unterdrückt die Phagen-DNS-Synthese. Sowohl das c_1 -, als auch das c_2 - und c_3 -Genprodukt sind für die Lysogenisierung notwendig (Smith u. Levin, 1964).

Die verschiedenen c-Mutanten sind aufgrund ihrer Plaquemorphologie nicht zu unterscheiden. Sie bilden alle drei klare Plaques. Es war jedoch von Interesse zu wissen, in welchem c-Gen eine Klarplaquemutante verändert war. Aus diesem Grund wurde der Mutationsort der interessierenden Mutante durch Komplementation bestimmt.

Zur Durchführung der Komplementation wird auf einer NA-Platte 0,1 ml einer ÜK vorplattiert. Ist die Platte trocken, wird ein Tropfen eines Lysates von einer c_1 -Mutante mit dem Titer 10^9 Phagen/ml aufgetropft. Auf eine andere Stelle der Platte wird ein Tropfen einer c_2 -Mutante mit gleichem Titer aufgetropft. Auf diese beiden Tropfareale werden dann je ein Tropfen der zu bestimmenden Mutante aufgetragen. Das Lysat dieser Phagenmutante sollte den gleichen Titer aufweisen wie die beiden c-Mutanten. Die Platte wird ca. 16 Stunden bei 37°C bebrütet. Ist das Plaqueareal, auf das die c_1 -Mutante aufgetropft wurde, trüb, so trägt die aufgetragene Mutante eine Mutation im c_2 -Gen. Ist das Plaqueareal der c_1 -Mutante klar, das der c_2 -Mutante trüb, so enthält die zu bestimmende Mutante eine Mutation im c_1 -Gen. Sind beide Plaqueareale trüb, so trägt die zu bestimmende Mutante eine c_3 -Mutation.

16. Radioaktivitätsmessungen

Es werden zwei Szintillationslösungen verwendet, da sowohl an Filter gebundene Radioaktivität, als auch radioaktive Flüssigkeiten gemessen werden.

- (a) Die Messung von radioaktiven Flüssigkeiten erfolgt in einem Szintillationsmix, der aus 330 ml Triton X-100 und 670 ml Toluol besteht. Pro Liter Triton-Toluol-Mischung werden außerdem 5,5 g PPO und 100 mg dimethyl-POPOP zugegeben. Von diesem Triton-Toluol-Szintillator werden 5 ml in ein Zählgläschen gefüllt. 50 μl der zu messenden Probe werden zu dem Szintillations-

reagenz gegeben und durch Schütteln gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt. Die zu messenden Impulse/Zeit werden in einem Szintillationszähler vom Typ "Nuclear Chicago-Mark II" bestimmt.

- (b) An Filter gebundene Radioaktivität wird in Toluol-Szintillator gemessen. Als Szintillationslösung dient 1 l Toluol, dem 5 g PPO und 300 mg dimethyl-POPOP zugesetzt werden. Die Proben werden auf Filter gegeben und getrocknet. Die getrockneten Filter werden in 5 ml Toluol-Szintillationsflüssigkeit gelegt und die Impulse/Zeit bestimmt.

17. Proteinbestimmung

Es wird die Methode von Lowry et al. (1951) angewendet. Folgende Lösungen werden als Stammlösungen bei 4°C aufbewahrt:

Lösung A: 20 g NaCO_3
 0,5 g Na-Tartrat
 100 ml 1 mol/l NaOH
 auffüllen auf 1000 ml mit dest. Wasser

Lösung B: 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot x \text{H}_2\text{O}$
 mit dest. Wasser auffüllen auf 1000 ml

Folin-Phenolreagenz

Unmittelbar vor dem Test werden 1 ml Lösung B und 9 ml der Lösung A vermischt. Zum Standardansatz kommen davon 2,5 ml und 0,5 ml der proteinhaltigen Probe. Nach 10 min bei Raumtemperatur werden 0,25 ml verdünntes Folin-Phenolreagenz (Folin-Phenolreagenz : H_2O = 1 : 1) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird bei 750 nm gegen eine gleichbleibende Blindprobe (Wasser oder Puffer anstatt Protein) gemessen.

18. Herstellung von Proteinextrakten mit ^{14}C -markierten Aminosäuren zur Autoradiographie

Angereichertes M9-Medium (siehe Ergebnisse) wird in der Verdünnung 1:50 mit einer UK der Salmonella-Mutante 4010 infiziert. Es wird bei 37°C solange belüftet, bis eine Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml erreicht ist. Die Kultur wird in 5 ml-Portionen in Glaspetrischalen mit UV-Licht bestrahlt, welche anschließend im Eisbad gesammelt werden. Die bestrahlten Bakterien werden bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in frischem M9-Medium suspendiert. Diese Kultur wird in mehrere Proben aufgeteilt. Jede dieser Proben wird

mit einer der zu untersuchenden Phagenmutanten mit einer $moi = 10$ infiziert.

Haben die Phagenlysate, die zum Infizieren benutzt werden, so niedrige Titer, daß sie die Proben zu stark verdünnen, läßt man die Phagen erst einmal an die Bakterien adsorbieren. Dies kann auf zweierlei Arten geschehen.

- (a) Das Phagenlysat wird zu den Bakterien gegeben und der Ansatz nach 10 min in Eis gestellt. Anschließend wird zentrifugiert und das Pellet (Bakterien und adsorbierte Phagen) in frischem Medium aufgenommen.
- (b) Nach der Zugabe der Phagen zu den Bakterien werden 0,01 ml einer 0,2 mol/l KCN-Lösung pro ml Kultur zugegeben (Endkonzentration 2×10^{-3} mol/l KCN). Durch die Zugabe von KCN wird der bakterielle Stoffwechsel unterbrochen. Die Phagen können an die Zellwand adsorbieren und die DNS injizieren. Replizieren können sie sich aber erst, wenn das KCN aus den Zellen herausverdünnt wurde. Diese Methode wird verwendet, wenn die Phagenreifung synchronisiert werden soll. Der Ansatz bleibt unbelüftet 10 min bei 37°C stehen. Dann wird zentrifugiert, das Pellet in M9-Puffer aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien werden mit den adsorbierten Phagen in angereichertem M9-Medium suspendiert.

Nach durchgeführtem Medienwechsel und Infektion mit unterschiedlichen Phagenmutanten wird pro ml Kultur 1 μCi ^{14}C -Aminosäuremischung zugegeben. Die Proben werden 30 min bei 37°C belüftet und anschließend in der Minifuge zentrifugiert. Das Pellet - nicht lysierte infizierte Bakterien - wird in 1/10 Volumen 1 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 aufgenommen. Die konzentrierten Proben werden mit gleichem Volumen Probenpuffer versetzt und durch 5-maliges Einfrieren in flüssigem N_2 und Auftauen im 37°C -Wasserbad geöffnet (Kreutinger, Diplomarbeit, 1976). Zur Denaturierung der Proteine werden die Proben 5 min gekocht, bevor sie auf Polyacrylamid-Gele aufgetragen werden.

19. Herstellung von Proteinextrakten mit ^{14}C -markierten Aminosäuren zur Filterbindung

Entsprechend dem vorhergehenden Kapitel bestrahlte Bakterien werden mit der Phagenmutante am 13 c^+ (oder am 13 c_2^-) mit einer $moi = 10$ infiziert. Diesem Ansatz werden 1 μCi ^{14}C -markierte Aminosäuren pro ml zugegeben. Es wird 90 min bei 37°C im Dunkeln belüftet. Dann wird in der Minifuge zentrifugiert und das Pellet in 5 ml Lysis-Puffer (Echols u. Green, 1971) aufgenommen. Die suspendierten Bakterien werden erneut zentrifugiert und das Pellet über Nacht bei -18°C in der Tiefkühltruhe eingefroren. Am

nächsten Tag wird das Pellet aufgetaut und in 3 ml Lysis-Puffer aufgenommen. Lysozym wird bis zu einer Endkonzentration von 330 µg/ml zugefügt. Der Ansatz wird unbelüftet 5 min bei 37°C belassen. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird $MgCl_2$ bis zu einer Konzentration von 50 mmol/l zugegeben. 2-Mercaptoäthanol wird hinzugefügt, bis eine Konzentration von 14 mmol/l erreicht ist. Zum Schluß wird noch Brij 58 bis zu einer Konzentration von 0,5% zugesetzt. Der Ansatz bleibt über Nacht im Kühlraum stehen, wodurch die Lyse erfolgt, und wird am nächsten Tag gegen den Dialyse-Puffer dialysiert. Der Dialyse-Puffer wird dreimal gewechselt.

Zur Zerstörung der am Dialyseschlauch eventuell haftenden Nukleasen und Proteasen wird dieser vor Gebrauch folgender Behandlung unterzogen:

Der Dialyseschlauch wird 15 min in 0,1 mol/l $NaHCO_3$ gekocht. Das $NaHCO_3$ wird dekantiert und der Dialyseschlauch nun 60 min in 3,75 g/l EDTA gerührt. Nach einer Stunde wird das EDTA entfernt und der Dialyseschlauch 2 x 60 min in dest. Wasser gerührt. Der Dialyseschlauch wird im Kühlraum bei 4°C in dest. Wasser aufbewahrt.

20. Sucrosegradienten

In einem 5 ml-(bzw. 17 ml-)Zentrifugenröhrchen aus Zello-senitrat wird ein neutraler linearer Sucrosegradient gemischt. Als unterste Schicht wird ein "Kissen" in das Zellulosenitratröhrchen gefüllt. Dieses "Kissen" besteht aus 0,5 ml $CsCl$ -Lösung (1,2 g $CsCl$ /ml 50%ige Sucroselösung - Strätling, Krause, Knippers, 1973; bzw. 1 ml 66% v/v Sucrose). Auf dieses "Kissen" wird ein 5-20%iger (bzw. 5-50%iger) Gradient gemischt, indem von der jeweils geringer konzentrierten Sucroselösung 2,1 ml (7 ml) und von der höher konzentrierten Sucroselösung 2,2 ml (8 ml) verwendet werden. Auf diesen Gradienten werden dann 0,1 ml (0,5 ml) Probe aufgetragen. Nach Beendigung der Zentrifugation werden die Röhrchen am Boden angestoßen und auf Glasfaserfilter (bzw. in Eppendorf-Reaktionsgefäße) fraktioniert.

21. Gelfiltration auf Sephadex G 100

Die Methode der Gelfiltration wird gewählt, um die Proteine aus einem Lysat von am 13 c₂-Mutanten nach ihrer Größe aufzutrennen. Da die Molekulargewichte der P22-Proteine in der Größenordnung von 10.000 bis 100.000 d liegen, bietet sich als Material Sephadex G 100 von Pharmacia Fine Chemicals an, dessen Auflösungsbereich von 4.000 bis 150.000 d reicht. Das Material wird 24 Stunden bei Raumtemperatur in Bindungspuffer gequollen und eine halbe

Stunde an der Wasserstrahlpumpe entlüftet. Es ergibt sich dabei ein Volumen von 15 bis 20 ml/g Trockengewicht.

Das Gel wird in eine Säule (2,5 x 50 cm) gegossen und mit Bindungspuffer bis zur konstanten Betthöhe äquilibriert. Die Durchflußrate wird dabei mittels einer Pumpe bei 10 ml/h konstant gehalten. Die Proteinlösung wird zusammen mit Dextranblau 2000 (MG 2.000.000) als Front- und Phenolrot (MG 345) als Schlußindikator aufgetragen und mit Bindungspuffer eluiert. Zur besseren Auftrennung der Proteine enthielt der Bindungspuffer hier 0,5 mol/l KCl. Das Eluat zwischen Front- und Schlußindikator wurde in Fraktionen zu je 2 ml gesammelt.

22. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

Als Ionenaustauscher wird der schwach basische Anionenaustauscher DE 22 von Whatman Ltd. gewählt. Hier sind positiv geladene Diäthylaminoäthyl-Gruppen an eine Zellulose-Matrix gebunden. Die (negativen) Chlorid-Gegenionen können reversibel gegen Moleküle der zu trennenden Komponenten ausgetauscht werden. Durch einen Salzgradienten (KCl) können diese Moleküle aufgrund ihrer verschiedenen Bindungsstärken nacheinander wieder abgetrennt und eluiert werden.

Eine bestimmte Menge DE 22 wird in 15 Volumenteilen (v/w) 0,5 mol/l HCl 30 min gerührt, abfiltriert und mit dest. Wasser gewaschen, bis der pH 4,0 beträgt. Dann folgt die gleiche Behandlung in 15 Volumenteilen 0,5 mol/l NaOH. Nachdem bis zur Neutrität gewaschen ist, wird der pH mit HCl auf 4,5 eingestellt und das Gel an der Wasserstrahlpumpe entgast. Mit Bindungspuffer wird das Gel äquilibriert, bis pH der Probe und des Puffers gleich sind. Nachdem sich das Gel nach 30 min gesetzt hat, wird der Überstand (er enthält Schwebstoffe) dekantiert und das Gel in eine Säule (2,5 x 20 cm) gegossen. Mit Bindungspuffer wird solange gewaschen (Durchflußrate ca. 150 ml/h), bis eine konstante Betthöhe erreicht ist. Dann wird mit 50 ml/h der am 13 c_2^- -Extrakt aufgepumpt und mit mindestens 2 Säulenvolumen Bindungspuffer gewaschen (100 ml/h).

Mit einem kontinuierlichen KCl-Gradienten (0 bis 1 mol/l KCl, 2 Säulenvolumina) werden die Proteine eluiert und in Fraktionen zu 2 ml gesammelt. Die Säule wird anschließend mit Bindungspuffer regeneriert.

C) ERGEBNISSE

=====

1. Problemstellung und Erarbeitung verwendbarer Methoden

In der vorliegenden Arbeit sollten Proteine untersucht werden, deren Synthese nach Phageninfektion induziert wird. Ein Ziel war es, Phagen-spezifische Proteine mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelen und Proteinextrakten von Zellen, welche mit amber-Mutanten infiziert waren, zu identifizieren. Desweiteren sollte versucht werden, die Bindungsfähigkeit von Phagenproteinen an DNS zu prüfen.

Um die erste Fragestellung bearbeiten zu können, waren folgende Voraussetzungen zu erfüllen:

- (a) Ein geeignetes Wirtsbakterium. Die Synthese bakterieller Proteine sollte abschaltbar sein, jedoch nicht die des später infizierenden Phagen.
- (b) Die Trocknung und Konservierung der SDS-Polyacrylamid-Gele sollte keine Schwierigkeiten mehr bereiten, da die getrockneten Gele mit den Röntgenfilmen in Kontakt gebracht werden mußten.
- (c) Es sollte möglich sein, auch kleine Mengen an Phagen-eigenen Proteinen festzustellen.

1.1 Wachstumsbedingungen für den Bakterienstamm 4010

Bei UV-sensiblen Bakterienmutanten ist die zelleigene Proteinsynthese durch UV-Bestrahlung abschaltbar. Zu diesen Mutanten zählt auch der Bakterienstamm 4010. Dieser Stamm (von B. Ames = TA 1530) enthält eine Deletion, die folgende Marker betrifft: his G46 Δ (chl D - uvr B - bio - gal).

Um diesen Stamm zum Wachsen zu bringen, mußte ein Minimalmedium mit Histidin und Biotin supplementiert werden. Da u.a. das gal E-Gen durch Deletion verloren ging - es betrifft die Epimerase - kann das Bakterium, wenn es in M9-Medium gezogen wird, keine Glukose in Galaktose umwandeln. Diese Mutation beeinträchtigt das Wachstum des Bakteriums in keiner Weise, da Galaktose für den Aufbau der Zellwand selbst nicht notwendig ist. Allerdings sind die Bakterien, die in M9-Medium ohne Galaktose gezogen wurden, resistent gegen den Salmonella-Phagen P22. Es hat sich gezeigt, daß vor allem die Rezeptorstellen für Phagen eine Anreicherung an eingebauter Galaktose aufweisen. Um also eine Phagenadsorption an diese Bakterienmutante zu ermöglichen, muß dem Medium Galaktose zugesetzt werden

(Botstein, Waddell, King, 1973).

Für diesen Bakterienstamm sollten nun Bedingungen gesucht werden, die nach dem Einstellen des Koloniewachstums durch UV-Bestrahlung trotzdem eine Phagenvermehrung in relativ "normaler" Rate zuließen. Der Stamm 4010 wurde daher in M9-Medium gezogen, das unterschiedliche Konzentrationen an Galaktose und MgSO_4 enthielt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Medien ist in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verschiedenen M9-Medien.

	Medium I	Medium II	Medium III	Medium IV
M9	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Biotin	0,1 μg	0,1 μg	0,1 μg	0,1 μg
Histidin	2000 μg	2000 μg	2000 μg	2000 μg
20% Glukose	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
20% Galaktose	0,25 ml	0,50 ml	0,25 ml	0,50 ml
MgSO_4 0,1 mol/l	1 ml	1 ml	0,1 ml	0,1 ml

M9-Medium wurde in der Verdünnung 1:50 aus einer ÜK vom Stamm 4010 beimpft und bei 37°C solange belüftet, bis eine Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml erreicht war. Nach Erreichen dieses Titers wurde die Kultur gekühlt, in 5 ml-Proben aufgeteilt und verschieden lange mit UV-Licht bestrahlt, und zwar von 1.500 erg/mm^2 bis 3.200 erg/mm^2 in Schritten von je 100 erg/mm^2 . Die bestrahlten Proben wurden separat in Reagenzgläsern in der Kälte aufbewahrt. Diese Proben wurden zwei Prüfungen unterzogen.

- Es wurde eine Verdünnung durchgeführt, um das Koloniewachstum zu testen (siehe Tabelle 2).
- Die Proben wurden mit dem Phagen H5 infiziert ($\text{moi} = 5$), um die Phagenvermehrung zu untersuchen (Abbildung 2).

Um die Phagenreplikation zu synchronisieren, wurde den Proben KCN bis zu einer Endkonzentration von 2×10^{-3} mol/l zugesetzt. Die Proben blieben unbelüftet 10 min bei 37°C stehen. Dann wurden die Proben in der Minifuge zentrifugiert und das Pellet in M9-Puffer suspendiert, erneut zentrifugiert und das Pellet in frischem M9-Medium aufgenommen. Nun wurden die Proben 90 min bei 37°C belüftet. Um die Zellen ganz sicher zu lysieren, setzte man den Proben einen Tropfen Chloroform zu und belüftete solange weiter, bis das Chloroform verdampft war. Nach erneuter Zentrifugation wurde von dem Überstand, dem Phagenlysat, der Titer auf LT-2 als Indikator bestimmt.

Die Abbildung 2 zeigt die Abhängigkeit der Phagen-

vermehrung von der Art des M9-Mediums und der Dauer der UV-Bestrahlung.

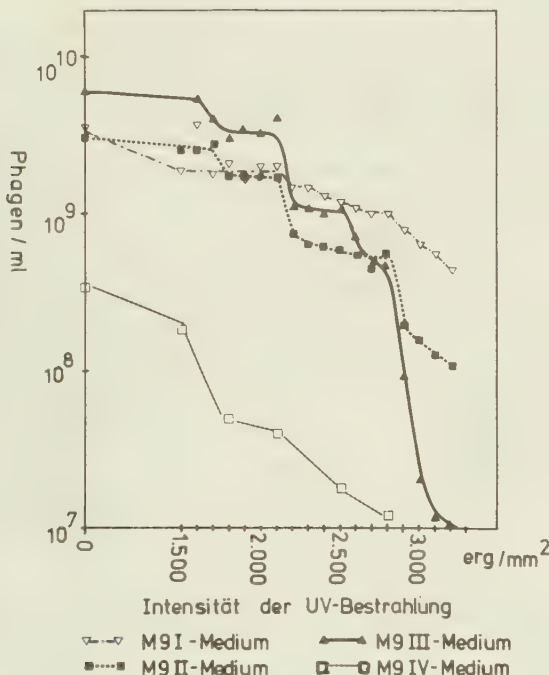


Abbildung 2: Vermehrung des Phagen H5 auf der Bakterienmutante 4010 in verschiedenen Medien und nach unterschiedlich langer Bestrahlung mit UV-Licht.

Wie aus der Abbildung 2 zu entnehmen ist, zeigte sich bei der Strahlendosis von 1.600 bis 1.700 erg/mm² ein erstes Abknicken aller Kurven. Ein zweites, deutlicheres Abknicken war bei 2.100 erg/mm² zu beobachten. Bis zu dieser Strahlendosis konnten sich die Phagen noch relativ unbehindert in den Bakterienzellen entwickeln, die vor der Infektion bestrahlt worden waren. Bei der Kurve, die die Phagenvermehrung im M9-III-Medium anzeigt, war nach 2.500 erg/mm² ein weiteres Abknicken zu erkennen. Eine nochmalige Reduzierung der Phagenvermehrung war nach der Bestrahlung der Bakterienzellen mit mehr als 2.800 erg/mm² zu sehen, und zwar sehr deutlich bei den Kurven, die die Phagenvermehrung in den Medien M9-II und M9-III darstellen.

Für die weiteren Versuche wurde eine Strahlendosis von 2.100 erg/mm² gewählt, da bei dieser Strahlenbelastung die Bakterien ihr Koloniewachstum eingestellt hatten (Tabelle

2), d.h. ihre Proteinsynthese sehr wahrscheinlich weitgehend abgeschaltet war (siehe Abbildung 3), aber die Phagenvermehrung noch nicht von der UV-Bestrahlung beeinflusst wurde.

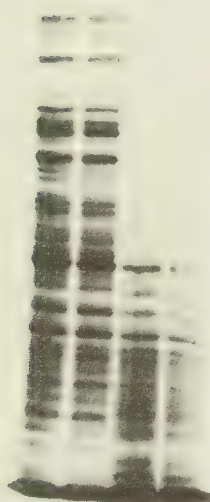
Es zeigte sich in diesen Versuchen, daß das M9-III-Medium das geeignete Medium war, denn es ermöglichte die beste Phagenvermehrung. Für alle weiteren Versuche wurde es als supplementiertes M9-Medium benutzt.

Tabelle 2: Das Koloniewachstum des Bakterienstammes 4010 nach UV-Bestrahlung in verschiedenen Medien (Zellen/ml)

	M9-I	M9-II	M9-III	M9-IV
unbestrahlt	2×10^8	2×10^8	4×10^8	$1,8 \times 10^8$
bestrahlt mit:				
1.500 erg/mm ²	2×10^2	1×10^2	3×10^4	6×10^4
1.600 erg/mm ²	1×10^2	1×10^2	< 10	< 10
1.700 erg/mm ²	< 10	1×10^1	< 10	2×10^1
1.800 erg/mm ²	< 10	2×10^1	< 10	1×10^1
1.900 erg/mm ²	< 10	< 10	< 10	< 10
2.000 erg/mm ²	< 10	< 10	< 10	< 10
2.100 erg/mm ²	< 10	< 10	< 10	< 10

Um zu zeigen, daß die Proteinsynthese des Bakterienstammes 4010 nach UV-Bestrahlung weitgehend abgeschaltet ist, wird ein Vergleich der Bandenmuster von nicht infizierten Bakterien mit und ohne Bestrahlung mit UV-Licht vorweggenommen, obwohl die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erst in Kapitel 1.2 beschrieben und auch die Identifizierung von Phagenproteinen erst im Kapitel 2 erklärt wird.

Zu diesem Zweck wurden die Proteine einer bestrahlten und einer unbestrahlten Kultur der Bakterienmutante 4010 radioaktiv markiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 3 gibt das Bandenmuster dieser beiden Auftrennungen wieder. Es ist sehr gut zu erkennen, daß die bakteriellen Proteine mit hohem Molekulargewicht nicht mehr synthetisiert werden, wohl aber die Proteine mit kleinerem Molekulargewicht eine Restmarkierung aufweisen. Dies dürfte dadurch zu erklären sein, daß auf kurzen DNS-Abschnitten mit geringerer Wahrscheinlichkeit ein UV-Schaden gesetzt wird als in größeren Bereichen.



ohne UV-Be-
strahlung

nach UV-Be-
strahlung

Abbildung 3: Bandenmuster bakterieller Proteine aus bestrahlten und unbestrahlten Zellen

1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nachdem die Bedingungen für den Bakterienstamm 4010 untersucht und die optimalen Voraussetzungen für die Phagenvermehrung bei Unterbrechung des Bakterienwachstums gefunden waren, konnte die Frage behandelt werden, wie Proteinextrakte von verschiedenen Phagenmutanten aufzutrennen und gegebenenfalls Veränderungen von Proteinen bei einzelnen Mutanten aufzuzeigen wären.

Eine Möglichkeit zur Auftrennung von Proteinen aus Proteinextrakten und zur Darstellung von Unterschieden im Bandenmuster der einzelnen Mutanten ist die Gelelektrophorese. Dabei werden die Proteine eines Proteingemisches aufgrund ihrer Ladung getrennt. Versetzt man die Proteinmischung jedoch mit dem Detergenz Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), so dissoziieren Proteinkomplexe in die Polypeptid-

ketten, aus denen die Komplexe bestehen. Die Proteine reagieren mit dem SDS und sind dadurch negativ geladen, wobei die negative Ladung des SDS die Protein-eigene Ladung maskiert. Proteine, die mit SDS behandelt werden, nehmen eine lineare Struktur an, die proportional dem Molekulargewicht ist (Weber et al., 1969; Segrest et al., 1972; Weber et al., 1972). Kleinere Proteine wandern schneller als größere Proteine, da die kleineren Moleküle von dem "Gittergerüst" des Polyacrylamids nicht so stark behindert werden wie die größeren Proteine. Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können aber nicht nur Proteinextrakte aufgetrennt und Unterschiede bestimmter Proteine im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, sondern man kann auch das Molekulargewicht der Proteine bestimmen, indem man ihre Wanderungsgeschwindigkeit in dem SDS-Polyacrylamid-Gel der Bestimmung zu Grunde legt.

Es wurde zunächst versucht, die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Methode und mit der Apparatur von Stegemann (1968) durchzuführen. Dabei wurde ein Plattengel verwendet, welches im Trenngel die Probentaschen enthielt. Nach dieser Methode war es jedoch nicht möglich, eine scharfe Trennung der Banden zu erreichen. Zum Teil war das "Verschwimmen" der Banden wohl darauf zurückzuführen, daß kein Sammelgel vorhanden war, in welchem die Proteine vor der Auftrennung in einzelne Banden erst einmal in einer scharfen Bande gesammelt wurden. Aus diesem Grunde wurde nach einer Methode gesucht, die scharfe Banden lieferte.

Die Methode, die von Laemmli 1970 beschrieben wurde, konnte den Nachteil der Stegemann-Methode eliminieren. Sie besitzt ein niedrig-konzentriertes Sammelgel und ein höher-konzentriertes Trenngel und liefert daher scharfe Banden. Die Dicke der Gele ist mit der Dicke der Abstandshalter variierbar.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden nach der Methode von Laemmli und mit der von Studier entwickelten Apparatur durchgeführt. Es wurden hauptsächlich 1 mm-SDS-Polyacrylamid-Gele gegossen. Zur präparativen Aufarbeitung der Proteine wurden auch 3 mm-SDS-freie Polyacrylamid-Gele benutzt, deren Herstellung der der SDS-Polyacrylamid-Gele gleicht, jedoch wurde bei den SDS-freien Gelen in den Stammlösungen und im Elektrophoresepuffer das SDS weggelassen.

Die Prozedur der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sah dann wie folgt aus. Nachdem die Plattengele polymerisiert waren, wurden die Probentaschen in dem Sammelgel mit dem zu trennenden Proteinextrakt gefüllt und der Proteinextrakt Phagen-infizierter Zellen wurde elektrophoretisch in die einzelnen Komponenten aufgetrennt. An diese Auftrennung der Proteine schloß sich die Fixierung der Polypeptidketten durch eine Mischung aus Methanol, Eisessig und Wasser in dem Gittergerüst des Polyacrylamids an. Dies geschah gleichzeitig mit dem Färben der Proteine und des Polyacryl-

amids und dem nachfolgenden Entfärben des Polyacrylamids. Anschließend wurden die Gele getrocknet und autoradiographiert.

1.3 Methode der Geltrocknung

Die Proteinextrakte, die in SDS-Polyacrylamid-Gele in diskrete Banden aufgetrennt werden sollten, waren mit ^{14}C -Aminosäuren radioaktiv markiert. Um diese markierten Proteinbanden nachzuweisen, mußten die Gele autoradiographiert werden. Es war daher notwendig, die Gele zu trocknen, um sie anschließend zur Autoradiographie mit Röntgenfilmen in Kontakt zu bringen.

Versuche, die Gele bei Raumtemperatur auf Holzplatten oder auf fettfreien Glasplatten zu trocknen, erwiesen sich als ungeeignet, da die Trocknung der Gele zu viel Zeit benötigte. Wurden die Gele hingegen bei höheren Temperaturen getrocknet, so verformten sie sich. Daher wurde untersucht, ob die Gele durch Dehydratation zu trocknen wären. Dabei sollte das Wasser im Gel durch Methanol ersetzt werden, das dann durch Verdampfen aus dem Gel entfernt werden konnte. Bei diesem Vorgehen trat eine Schrumpfung der Gele um 70 bis 80% ein, was eine Auswertung sehr erschwert hätte. Dieser Schrumpfungsprozess konnte zwar gesenkt werden (bis auf 38%), jedoch mußte dazu relativ viel Zeit aufgewendet werden.

Schließlich wurde die Methode von Fairbanks et al. (1965) zur Trocknung von Plattengelen erprobt und dann in modifizierter Weise übernommen. Bei dieser Methode wurde das Gel auf ca. 100°C erhitzt und der entstehende Wasserdampf durch ein angelegtes Vakuum sofort abgesaugt. Dadurch konnte verhindert werden, daß im Gel Luftblasen entstanden. Gleichzeitig wurde einer Verformung des Geles vorgebeugt.

Bei dieser Trocknungsmethode wurde in die Mitte einer Silikongummiplatte mit den Maßen 40 x 40 cm ein Stück Zellophanfolie gelegt, welches größer war, als das zu trocknende Gel. Auf diese Zellophanfolie wurde das nasse Plattengel aufgetragen und mit einem etwas größeren Stück Filterpapier, an dem das getrocknete Gel später als dünner Film haften blieb, zugedeckt. Das alles wurde mit einer Aluminiumplatte von den Abmessungen 28 x 22 x 0,5 cm beschwert. Die Aluminiumplatte sorgte beim Anlegen des Vakuums für eine plane Fläche und diente außerdem noch als stabile Auflage über dem Wasserbad beim Trocknungsvorgang. Auf der dem Gel abgewandten Seite war die Aluminiumplatte mit einem Fliegendrahtgitter umhüllt, das um die Kanten der Platte gebogen war. Durch dieses Fliegendrahtgitter blieben beim Anlegen des Vakuums genügend Zwischenräume, durch die der Wasserdampf abgesaugt werden konnte. Auf die Aluminiumplatte wurde eine zweite Silikongummiplatte der gleichen Größe wie die erste gelegt. Von dieser zweiten Gummiplatte führte in der

Mitte eine Schlauchverbindung zu einer Vakuumpumpe. Mit Hilfe dieser Pumpe wurde ein Vakuum angelegt, das die beiden Silikongummiplatten an den Rändern der Aluminiumplatte zusammenhielt. Einen Querschnitt durch den Aufbau dieser Trocknungsvorrichtung zeigt die Abbildung 4.

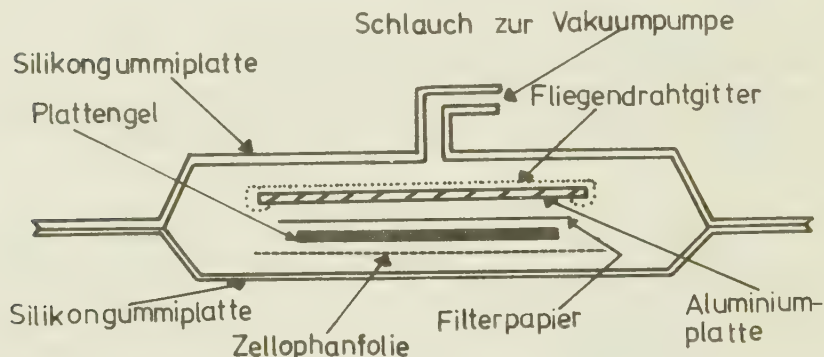


Abbildung 4: Querschnitt durch den Aufbau der Gel Trocknungsvorrichtung, in modifizierter Weise nach Fairbanks et al.

Sobald das Vakuum stabil war, wurde die ganze Vorrichtung über ein kochendes Wasserbad gebracht. Um das Öl in der Pumpe vor zuviel Feuchtigkeit zu schützen, wurde zwischen der Trockenvorrichtung und der Vakuumpumpe eine "Kältefalle" installiert. Außer dem Trocknungsmittel CaSO_4 befand sich zwischen Saugflasche und Trocknungsvorrichtung noch eine leere Woulfesche Flasche in einem Eisbad. Diese "Kältefalle" diente dazu, die heißen Wasserdämpfe zu kondensieren und aufzufangen. Die Trocknung eines Geles mit dieser Vorrichtung dauerte ca. 45 bis 60 min. Bei dieser Methode mußte sowohl ein geeignetes Filterpapier als auch die richtige Zellophanfolie verwendet werden. Die Zellophanfolie sollte hitze- und formbeständig sein und nicht mit dem Gel zusammenkleben, um sie nach der Beendigung des Trocknungsvorganges leicht und vollständig entfernen zu können. Dies war wichtig, da nach Entfernung der Zellophanfolie auf die gleiche Seite des Geles ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt wurde und Reste der Zellophanfolie eine partielle unterschiedliche Belichtung des Röntgenfilmes zur Folge gehabt hätten. Als geeignet hat sich die Bratfolie Nalophan von Kalle erwiesen.

Auch das zu verwendende Filterpapier mußte einige Voraussetzungen erfüllen. Es mußte saugfähig sein und durfte keine Faserung in einer bevorzugten Richtung aufweisen. Würde das Filterpapier eine Faserrichtung aufweisen, so würde eine

Verzerrung des Geles eintreten, bedingt durch die unterschiedliche Ausdehnung und Schrumpfung der Papierfasern bei Feuchtigkeit. Aus diesem Grunde wurden verschiedene Papiersorten getestet. Es erwiesen sich mehrere Sorten als geeignet, nämlich die Filterpapiere Nr. 601, 2668, 2992, und SL 23 von Schleicher & Schüll. Nach dem Trocknen lag das Gel als sehr dünner Film, einer Lackschicht vergleichbar, auf dem Filterpapier.

1.4 Methode zum schnellen Aufspüren geringer Mengen an Radioaktivität in Polyacrylamid-Gelen durch Szintillations-Autoradiographie

Die getrockneten, mit radioaktiv-markierten Proteinen beladenen Gele wurden zur Auswertung mit Röntgenfilmen in Kontakt gebracht. Diese Röntgenfilme wurden durch den Zerfall der radioaktiven Isotope belichtet und zeigten das Auftreten von Radioaktivität nach dem Entwickeln und Fixieren durch eine Schwärzung des Filmes an den Stellen an, an denen der Zerfall der Radioaktivität im Gel stattfand.

Um die Belichtungszeit der Röntgenfilme zu verkürzen, wurde die Methode von Bonner und Laskey (1974) benutzt. Diese Methode beruht auf der Tatsache, daß PPO die radioaktive Strahlung in den sichtbaren Bereich verschiebt. Bonner und Laskey haben auf diese Weise selbst geringe Mengen von niederenergetischer Strahlung (^3H) in kurzer Zeit auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Da PPO in Dimethylsulfoxid (DMSO) löslich ist, nicht jedoch in Wasser, muß das Wasser im Gel durch DMSO ersetzt werden, um das PPO in gelöster Form in das Gel zu bringen. Dies geschah auf folgende Weise.

Nach dem Entfärben des Geles wird es 30 min in dem 20-fachen Gelvolumen DMSO geschüttelt. 30 min später wird das jetzt Wasser enthaltende DMSO gegen ein gleiches Volumen wasserfreies DMSO ausgetauscht und erneut 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nun ist das Wasser im Gel weitgehend durch DMSO ersetzt. Das Gel wird nun in dem vierfachen Gelvolumen DMSO geschüttelt. Dieser geringen Menge DMSO wird kristallines PPO bis zu einer Konzentration von 16 % (w/v) zugesetzt und durch Schütteln gelöst. In diesem mit PPO angereicherten DMSO wird das Gel drei Stunden bei Raumtemperatur bewegt. In dieser Zeit gelangt das gelöste PPO in die Gitterstruktur des Polyacrylamid-Geles. Nach Ablauf der drei Stunden wird die PPO-Lösung dekantiert und durch Wasser ersetzt. Sobald das Wasser mit dem gelösten PPO in Kontakt kommt, fällt dieses aus, was an der milchig-weißen Trübung des Geles zu erkennen ist. Um auch den letzten Rest DMSO aus dem Gel zu verdrängen, wird eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit dem 20-fachen Gelvolumen Wasser geschüttelt. Dies ist zur Trocknung des Geles wichtig, da es über einem Wasserbad erhitzt wird, der Siedepunkt des DMSO aber sehr viel höher liegt.

Bei weiteren Versuchen konnte von mir gezeigt werden, daß es möglich war, die Belichtungszeit für Röntgenfilme noch weiter zu verkürzen. Wird dem DMSO außer PPO noch bis zu 1 % (w/v) dimethyl-POPPOP zugesetzt, so zeigen schwache Banden nach Behandlung mit diesem DMSO eine stärkere Schwärzung als vergleichbare Banden in Gelen, die nur PPO enthalten. Die Belichtung der Gele erfolgt bei -70°C bis -80°C und dauert normalerweise, wenn pro Tasche 50.000 - 60.000 cpm aufgetragen werden konnten, ca. 3 bis 4 Tage. Wenn jedoch nur sehr wenig Radioaktivität aufgetragen werden konnte, pro Tasche ca. 200 - 400 cpm, waren selbst bei Verwendung dieser Methoden Belichtungszeiten bis zu 4 Wochen notwendig.

2. Identifizierung von Proteinen

Proteine werden von Zellen jeder Art in vielfacher Aufbereitung und großer Variabilität, sowohl in bezug auf ihre Funktion als auch auf ihre Größe, produziert. Sie können *in vitro* aufgrund ihrer physikalischen und biochemischen Eigenschaften identifiziert werden.

2.1 Bestimmung der Molekulargewichte der Genprodukte

Eine wichtige Kenngröße für Proteine ist ihr jeweiliges Molekulargewicht. Da Proteinextrakte gut mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufzutrennen sind (siehe Kapitel 1.2), wurde diese Methode auch angewendet, um die Molekulargewichte von Proteinen zu bestimmen (Weber et al., 1969).

Zur Ermittlung der Molekulargewichte kann man mehrere Proteine mit bekanntem Molekulargewicht (=Eichproteine) in einer separaten Tasche des Geles mitlaufen lassen, auf dem die zu bestimmenden Proteine getrennt werden, oder aber mit den zu trennenden Proteinen in eine Tasche füllen. Dies ist aber nur dann sinnvoll, wenn zwischen den Eichproteinen und den zu charakterisierenden Proteinen unterschieden werden kann. Die Eichproteine und die Proteine der Zellextrakte konnten durch Färbung mit Coomassie Brilliant-Blue als Banden sichtbar gemacht werden. Eine Identifizierung der nach Phageninfektion synthetisierten Proteine war jedoch nur durch radioaktive Markierung und Autoradiographie der Gele möglich.

Bevor die Eichproteine auf die Gele aufgetragen wurden, war darauf zu achten, daß sie in dem gleichen Puffer gelöst und auf die gleiche Weise denaturiert wurden wie die Proteine des zu untersuchenden Proteinextraktes. Dies sollte getan werden, um solche Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen Proteine zu vermeiden, die auf unterschiedliche Pufferzusammensetzung oder Denatu-

rierungsdifferenzen zurückzuführen sind und letztlich keinen Größenunterschied darstellen würden.

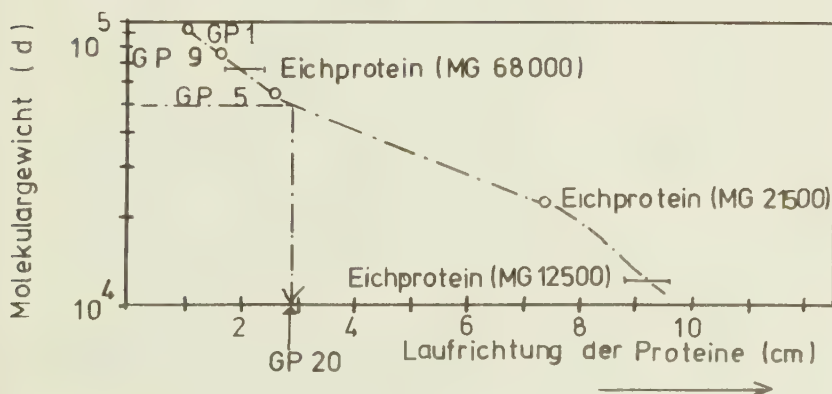
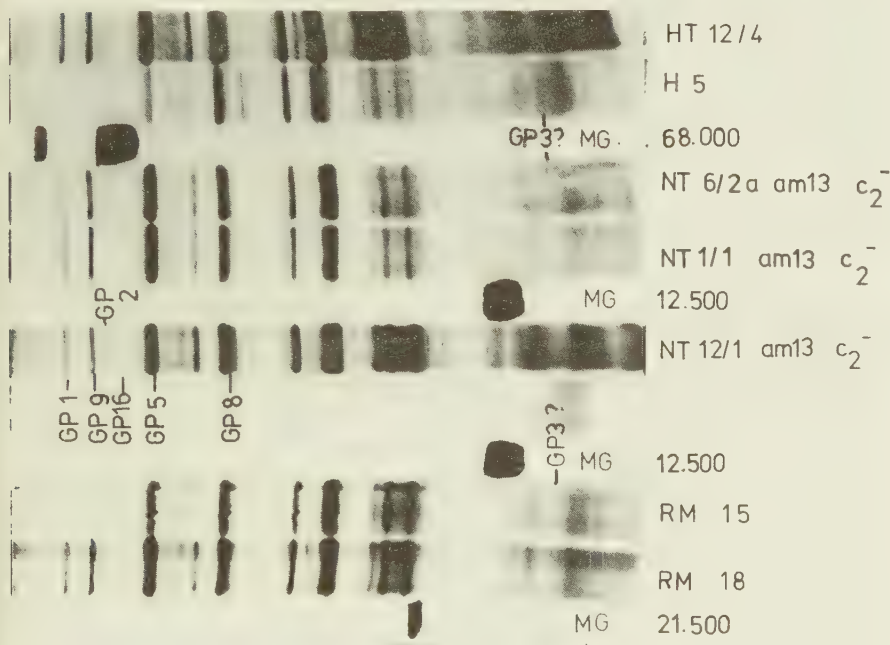


Abbildung 5: Fotografie eines 15 %igen Geles (oben) und dazugehörige Eichkurve (unten)

Nach der Auftrennung der Proteinextrakte konnten die Laufstrecken der einzelnen Eichproteine anhand der Anfärbung, und die der markierten Phagenproteine aufgrund der Autoradiographien ausgemessen werden. Durch Auftragen der Laufstrecken der Eichproteine gegen ihre bekannten Molekulargewichte erhielt man eine Eichkurve, aus der dann die Werte für die Phagenproteine ermittelt werden konnten (Abbildung 5). Bei dieser Methode der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen muß für jedes Gel eine eigene Eichkurve erstellt werden. Als Eichproteine können in einem Gel auch einige bekannte Proteine dienen, deren Lage leicht zu identifizieren ist und deren Molekulargewichte bekannt sind. So wurde bei der Eichkurve (Abbildung 6) für die Proteinauftrennung der Abbildung 5 verfahren. Dabei ist im Bereich der kleineren Molekulargewichte ein Bruch in der Linearität des logarithmisch aufgetragenen Molekulargewichtes zur Wanderungsstrecke der Proteine zu erkennen. Zur Überprüfung, ob die Eichkurve im Bereich der Molekulargewichte um 20.000 d einen "Knick" hat oder nicht, werden die Laufstrecken der Eichproteine von 21.500 d und 12.500 d ebenfalls eingezeichnet.

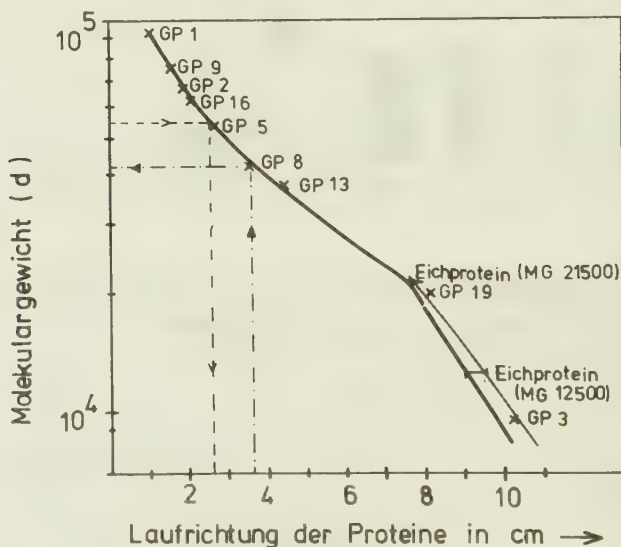


Abbildung 6: Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen. Hier für die Proteinauftrennung des in Abbildung 5 wiedergegebenen 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Geles.

Eine ähnliche Beobachtung wurde auch schon von Oppenheim

und Mitarbeitern (1977) gemacht. Diese Arbeitsgruppe führt das Abknicken der Linearität auf das Verhältnis von Bisacrylamid zu Acrylamid zurück. In den vorliegenden Gelen ist jedoch bis zu 20 mal mehr Bisacrylamid enthalten als dies bei denen von Oppenheim u. Mitarbeitern (1977) der Fall ist. Es muß daher noch eine andere Komponente für das Abknicken der Kurve der linear aufgetragenen Molekulargewichte mitverantwortlich sein. Da bei den beiden Methoden der Gelherstellung die Zusammensetzung der Elektrophoresepuffer unterschiedlich ist, könnte eventuell auch dies der Grund für das Abknicken der Kurve sein.

2.2 Identifizierung der Genprodukte des Phagen P22 mit Hilfe von am-Mutanten

Der Phage P22 codiert für ca. 30 - 40 Proteine. Von diesen sind, wie bereits erwähnt, 19 identifiziert. Im folgenden Abschnitt wird die Überprüfung der Angaben über diese Proteine sowie die Identifikation weiterer Phagen-codierter Proteine beschrieben. Die Proteine können mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einzelne Banden aufgetrennt werden. Wie kann man aber jetzt den einzelnen Genen bestimmte Proteine (=Genprodukte) zuordnen? Die einfachste Methode wäre wohl die, daß man den Extrakt von Zellen, die mit einer Phagenmutante infiziert waren, die ein bestimmtes Protein nicht mehr synthetisieren kann, mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auftrennt. Bei dem Vergleich des Bandenmusters z.B. eines Wildtyp-Phagen mit einer bestimmten Mutante müßte eine Bande ausfallen, nämlich die Bande, die dem Protein entspricht, welches von der Mutante nicht mehr synthetisiert werden kann.

In der Regel kann sich eine Mutante, die ein bestimmtes Genprodukt nicht mehr synthetisieren kann, auch nicht mehr vermehren. Die Mutation ist also letal. Es wurden aber Phagenmutanten entdeckt, die sogenannten amber-Mutanten, deren Defekt als "conditional letal" bezeichnet wird. Eine amber-Mutation besteht oft nur aus dem Austausch einer Base im Genom, wobei ein Stopp-Codon entsteht, das den Kettenabbruch auf der Ebene der Translation zur Folge hat. Dadurch wird ein für die Replikation von Phagen meist nutzloses, verkürztes Protein synthetisiert. Es wurden Wirtsbakterien gefunden, die diese amber-Mutation (=am-Mutation) supprimieren können. Bei der Transkription wird dann das Triplet mit der ausgetauschten Base als eine sinnvolle Information abgelesen. In diesen sogenannten Suppressor-positiven (Su^+) Bakterien ist eine solche am-Mutation also nicht letal, sondern führt zur Phagenreplikation.

Die Extrakte aus Zellen, die mit am-Mutanten infiziert sind und in Su^- -Bakterienzellen gezogen werden, können im Vergleich zu Wildtyp-infizierten Extrakten zur Identifikation von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen dienen, da den

am-Extrakten, d.h. den Extrakten mit am-Mutanten infizierter Zellen, ja ein bestimmtes Genprodukt fehlt, nämlich das, dessen am-Mutation der Phage besitzt. Bei solchen Mutanten kommt es auch darauf an, ob die am-Mutation schon gleich am Anfang des Genes auftritt, oder erst relativ spät. Abhängig vom Ort der Mutation werden entsprechend verkürzte Proteine synthetisiert. Diese können zwar den letalen Effekt für die Zelle in der Regel nicht aufheben, sind aber unter Umständen als Proteine mit kleinerem Molekulargewicht in dem Proteinextrakt nachweisbar - als sogenannte am-Fragmente.

Zur Identifizierung von Genprodukten des Salmonella-Phagen P22 wurde die Salmonella-Mutante 4010, deren eigene Proteinsynthese durch UV-Bestrahlung abschaltbar ist und die außerdem noch die Eigenschaft besitzt, Suppressor-negativ zu sein, mit den verfügbaren am-Mutanten des Phagen P22 infiziert.

Um von Anfang an Unklarheiten zu vermeiden, wird der Verständlichkeit wegen im folgenden die Sprachregelung eingehalten, das z.B. die Bezeichnung am 2-Extrakt bedeutet, dieser Extrakt wurde aus Zellen gewonnen, welche mit am 2-Mutanten infiziert waren.

2.3 Zugeordnete Banden der SDS-Polyacrylamid-Gele

Zur Identifizierung der Genprodukte und Zuordnung dieser zu bestimmten Banden wurde mit 10 %igen und 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gele gearbeitet. Dabei fiel auf, daß von Gel zu Gel Unterschiede im Bandenmuster auftraten, selbst wenn es sich um Gele gleicher Konzentration handelte. Dies dürfte auf die unterschiedliche Polymerisation der einzelnen Gele zurückzuführen sein.

Es wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Mutanten zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese benutzt (siehe auch Abbildung 1).

Viele der benutzten Phagenmutanten enthielten noch eine zusätzliche am 13-Mutation. Diese verhindert die Lyse der infizierten Zellen, erlaubt aber die fortlaufende ungehinderte Synthese aller Phagen-codierten Produkte. Dies führte zur erwünschten Akkumulation markierter Phagenproteine. Desweiteren wurden, wenn eine Auswahl möglich war, lieber c_2^- - als c_2^+ -Mutanten verwendet, da diese wegen des fehlenden Repressors nicht lysogenisieren konnten. Die zur Infektion eingesetzten Phagen standen dann alle zur Phagenvermehrung zur Verfügung, was ebenfalls eine größere Ausbeute an Phagen-eigenen Proteinen mit sich brachte.

Tabelle 3: Verwendete Phagenmutanten

Phagenmutante	Mutation im Gen	Funktion des entsprechenden Genproduktes
H5	c ₂	Repressor
NT 12/1	1	DNS-Verpackung, Reifung d. Proheads
am 1	1	DNS-Verpackung, Reifung d. Proheads
am 2	2	DNS-Verpackung, Reifung d. Proheads
am 3	3	DNS-V., Reif. d. Proheads, Nuklease
HT 12/4	3	DNS-V., Reif. d. Proheads, Nuklease
HT 13/4	3	DNS-V., Reif. d. Proheads, Nuklease
NT 1/1	zwischen 19 u. 3	?
NT 6/2a	zwischen 5 u. 8	Kopf: Hauptkopfproteine und Scaffolding Protein (Prohead)
am 5	5	Hauptkopfprotein
am 8	8	Scaffolding Protein
am 9	9	Schwanzprotein (baseplate)
am 13	13	Lyse
am 19	19	Lyse

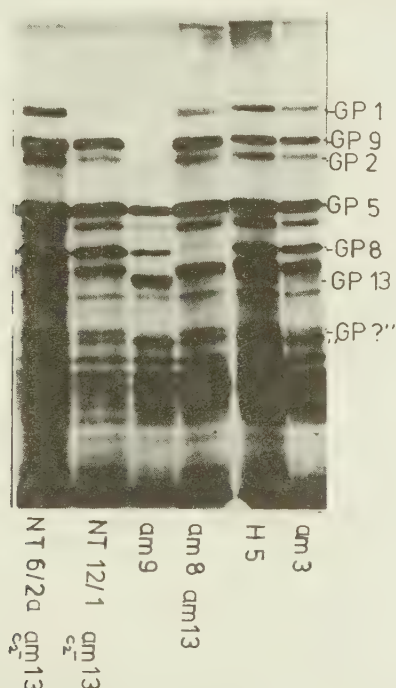


Abbildung 7: Bandenmuster verschiedener Phagenmutanten in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel.

Abbildung 7 zeigt das Fandenmuster verschiedener Phagenmutanten in einem 10 %igen Gel. Die Laufstrecke der kleinsten Proteine beträgt 9,2 bis 9,4 cm. Die Proteinextrakte konnten elektrophoretisch in 25 diskrete Fanden aufgetrennt werden.

Bei dieser Auftrennung können die Genprodukte 1, 9, 2, 5, 8 und 13 bestimmten Fanden zugeordnet werden, wobei die Banden der Genprodukte P 9 und P 8 durch ihr Fehlen bei den Mutanten am 9 und am 8 am 13 identifiziert werden können.

Die Proteine P 1, P 2, P 5, P 8 und P 9 wurden schon 1973 von Botstein und Mitarbeitern beschrieben, jedoch tritt dort das Genprodukt P 2 mit einem kleineren Molekulargewicht auf. Die Lage der Banden P 1, P 2 und P 5 wurde aus anderen Proteinauftrennungen übernommen. Die Mutanten H5 und am 3 (Abbildung 7) werden als "Wildtyp" herangezogen, um bei diesen das Vorhandensein der Bande P 13 im Vergleich mit den Doppelmutanten am 8 am 13 und NT 6/2a am 13c₂ aufzuzeigen. Diese Bande P 13, die bei den "Wildtyp"-Phagen H5 und am 13 als relativ schwache Bande zu erkennen ist, wird bei der Proteinauftrennung der Mutante am 9 sehr wahrscheinlich von der stark geschwärzten Proteinbande überlagert, die bei allen anderen Proteinauftrennungen zwischen den Banden P 8 und P 13 liegt. Diese Bande P 13 ist bei den Phagenmutanten am 8 am 13 und NT 6/2a am 13c₂ nicht zu erkennen. Dagegen tritt bei diesen Mutanten eine "dickere" Proteinbande "P ?" auf, deren Protein ein kleineres Molekulargewicht aufweist als das Protein der Bande P 13. Es liegt die Vermutung nahe, daß die Bande P 13 das Genprodukt 13 repräsentiert, welches von den am 13-Mutanten in verkürzter Form gebildet wird, die als "P ?" in Erscheinung tritt. Die Tatsache, daß "P ?" eine deutlich stärkere Schwärzung aufweist als P 13, könnte damit erklärt werden, daß es hier zu einer Überlagerung mit einem anderen Protein ähnlichen Molekulargewichtes kommt, welches als schwache Bande auch bei H5- und am 3-Extrakten an gleicher Stelle liegt.

Diese Vermutung wird auch durch die Tatsache gestützt, daß die Bande "P ?" bei der Proteinauftrennung der Phagenmutante am 9 nicht zu erkennen ist. Auch die geringe Schwärzung, die bei den Mutanten H5 und am 3 zu erkennen ist, fehlt bei der Mutante am 9. Dies spricht aber nicht gegen das Vorhandensein des noch nicht identifizierten Proteins, sondern ist sicherlich durch die insgesamt geringere Menge an aufgetrenntem Proteinextrakt verursacht, da auch weitere Proteinbanden dieser Mutante im Vergleich mit denen der anderen Phagenmutanten als geringer geschwärzt erscheinen.

Nimmt man an, daß die Bande P 13 in der Abbildung 7 bei den Phagen H5 und am 3 tatsächlich dem Genprodukt 13 entspricht, welches für die Lyse der Zellen mitverantwortlich ist, so kann diesem Genprodukt mit der in Kapitel 2.1 beschriebenen Methode ein Molekulargewicht von 38.000 d zugeordnet werden. Für eine endgültige Zuordnung müßte das Protein isoliert und einem biochemischen Test unterworfen

werden.

Bei dem Bandenmuster der Mutante am 9 (Abbildung 7) fällt auf, daß nicht nur die Bande völlig fehlt, welche das Protein 9 darstellt, sondern auch die Genprodukte 1 und 2 sehr schwach vertreten sind. Daß es sich um diese Produkte handelt, geht aus anderen Proteinauftrennungen (z.B. Abbildung 8: am 1 am 13 und am 2 am 13), sowie auch aus der Literatur (Botstein et al., 1973) hervor.

Die Proteinauftrennung dieser am 9-Mutante zeigt eine weitere Unstimmigkeit im Bandenmuster auf. Das Protein, welches zwischen den Banden P 8 und P 13 bei den anderen Mutanten relativ kräftig sichtbar ist, hat seine Lage verändert und scheint das Genprodukt P 13 (?), das nur eine schwache Bande bei den Mutanten H5 und am 3 bildet, zu überdecken. Im Verlauf dieser Untersuchungen wurde zwar der Versuch unternommen, dieses Protein, welches in der Proteinauftrennung der Mutante am 9 schneller läuft als in den übrigen Proteinauftrennungen, zu identifizieren, es konnte jedoch kein Ergebnis erzielt werden. Möglicherweise wird diese neue Bande von dem am 9-Fragment gebildet; die Stärke der Schwärzung spricht jedenfalls dafür. Die Proteinauftrennung dieser am 9-Mutante läßt vermuten, daß bei dieser noch eine weitere, bisher nicht kartierte Mutation vorliegt.

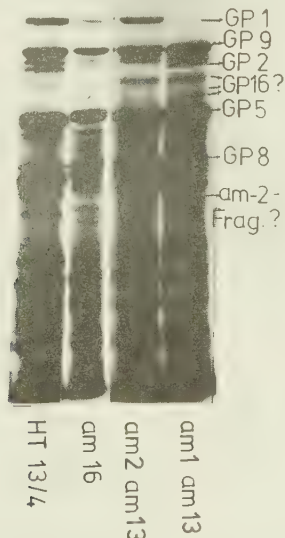


Abbildung 8: Bandenmuster verschiedener Phagenmutanten in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel

Weitere Informationen über Phagen-codierte Proteine erhält man aus dem Vergleich der Bandenmuster in Abbildung 8. So erkennt man hier deutlich, daß bei der Mutante am 2 am 13 die zweite Bande unterhalb des Genproduktes 9 fehlt, jedoch bei den Vergleichsextrakten vorhanden ist. Dies läßt den Schluß zu, daß es sich hierbei um das Genprodukt 2 handelt, das laut Literatur (Potstein u. Mitarbeiter, 1973; King et al., 1973; Susskind u. Potstein, 1978) in diesem Bereich zu erwarten ist. Dafür taucht bei diesem Extrakt eine neue Bande auf, welche bei den Vergleichsextrakten fehlt. Es könnte sich dabei um das am 2-Fragment handeln.

Beim weiteren Vergleich der Bandenmuster der auf Abbildung 8 dargestellten Phagenmutanten am 2 am 13 und am 16 ist zu erkennen, daß das Gen-16-Produkt ein kleineres Molekulargewicht haben muß als das Genprodukt 2. Dies kann daraus geschlossen werden, daß alle die Banden oberhalb vom Genprodukt 2, welche beim am 2 fehlt, beim am 16 vorhanden sind. Zwei dieser drei Proteine sind ohnehin als Genprodukt 1 und Genprodukt 9 einwandfrei identifiziert (Abbildungen 7, 8 und Literatur). Das dritte Protein, welches nicht identifiziert werden konnte, kommt als Genprodukt 16 nicht in Frage, da es von der Mutante am 16 in offenbar normaler Menge und Größe synthetisiert wird (siehe auch Abbildung 9). Somit ist das Genprodukt 16 unter den Proteinen zu suchen die schneller wandern als das Genprodukt 2 und muß daher kleiner als dieses sein. In der Tat fehlt bei der Proteinauftrennung der Mutante am 16 die Bande unterhalb von Genprodukt 2. Potstein und Mitarbeiter (1973), King und Mitarbeiter (1973) und Susskind und Potstein (1978) geben jedoch die Molekulargewichte des Genproduktes 16 mit 67.000 d und des Genproduktes 2 mit 63.000 d an. Um diese Unstimmigkeit zu klären, wurden von zwei verschiedenen Phagenmutanten, die beide einen amber-Defekt im Gen 16 aufweisen, Proteinextrakte hergestellt.

Während der Phagen-eigenen Proteinsynthese wurden 15 min, 30 min und 45 min nach Phageninfektion Proben des Ansatzes entnommen und lysiert. Die Proben wurden zusammen mit Proben anderer Phagenmutanten in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel untersucht. Die Bandenmuster sind in Abbildung 9 wiedergegeben.

Das Gel wurde absichtlich Überbelichtet, um auch die in geringer Menge vorhandenen Proteine als Bande auf dem Gel sichtbar zu machen. Durch die Überbelichtung des Röntgenfilmes sind die Proteinbanden nicht mehr so exakt voneinander zu trennen, vor allem im Bereich der Proteine mit Molekulargewichten von 25.000 d und weniger.

Bei beiden am 16-Mutanten (Entnahme der Proben 45 min nach Phageninfektion) sind unterhalb des Genproduktes 9 wiederum zwei Banden zu erkennen, wie auch schon in Abbildung 8. Die untere Bande wurde bereits als identisch mit dem Genprodukt 2 nachgewiesen (Abbildung 8). Auf der Abbildung 9

ist zu sehen, daß die nächste Bande, die bei den Mutanten am 8 und am 13 zu erkennen ist, bei den beiden am 16-Mutanten fehlt. Auch diese Beobachtung deckt sich mit der Situation in Abbildung 8. Dies würde dafür sprechen, daß es sich bei dieser Bande um das Genprodukt 16 handelt. Bestimmt man nach der in Kapitel 2.1 beschriebenen Methode die Molekulargewichte der beiden Proteine, so errechnet sich für das obere, als Genprodukt 2 identifizierte, der Wert 67.000 d, während für das als Genprodukt 16 angenommene kleinere Protein der Wert 63.000 d resultiert. Somit muß geschlossen werden, daß die Genprodukte 2 und 16 bisher in der Literatur verwechselt wurden.

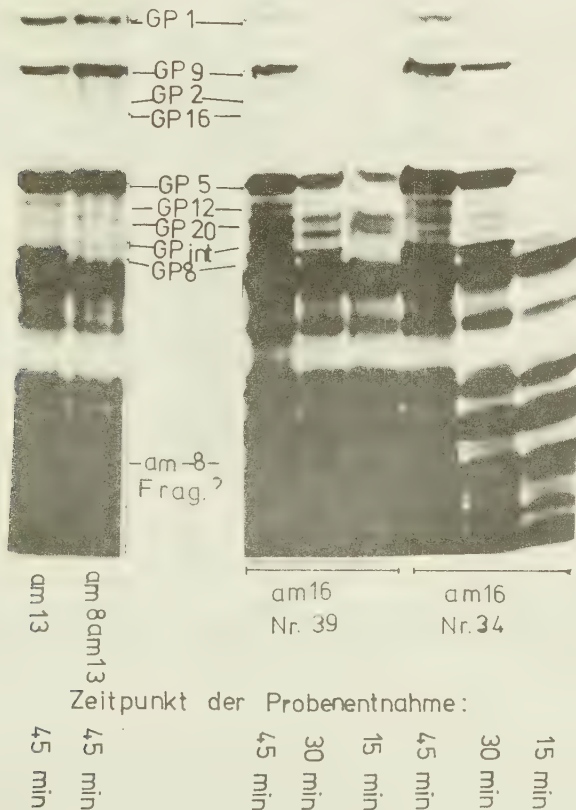


Abbildung 9: Elektrophoretische Auftrennung von Protein-extrakten verschiedener am 16-Mutanten zu verschiedenen Zeiten nach Phageninfektion im Vergleich mit Protein-extrakten anderer Phagemutanten 45 min nach Infektion

Durch die zeitlich unterschiedliche Probenentnahme bei diesen beiden am-Mutanten ist auch eine Aussage über den Beginn der Proteinsynthese unter den Versuchsbedingungen möglich. Diese Abbildungen machen deutlich, daß 15 min nach Phageninfektion bei beiden am-Mutanten weder ein Genprodukt 1, 9 oder 2 nachweisbar ist. Bei der am 16-Mutante Nr. 39 tritt zu diesem Zeitpunkt ein Protein auf, das kleiner ist als das Genprodukt 1 und welches bei der am-Mutante Nr. 34 nicht zu erkennen ist.

30 min nach Phageninfektion ist das Auftreten der Genprodukte 1, 9 und 2 bei der Mutante Nr. 34 nachweisbar, jedoch ist insgesamt weniger Protein zu erkennen als nach 45 min. Dieser Befund zeigt, daß diese "späten" Proteine nicht nur zu einem späteren Zeitpunkt gebraucht werden, sondern auch erst relativ spät im Verlauf der Phagenreifung synthetisiert werden. Das bei der Mutante Nr. 39 neu in Erscheinung tretende Protein mit einem Molekulargewicht von 90.000 d liegt nach 30 min Proteinsynthese in größerer Menge vor als nach 15 min, ist jedoch nach 45 min nicht mehr auffindbar. Das Genprodukt 2 hingegen ist auch nach 30 min noch nicht nachweisbar sondern taucht erst nach 45 min in "normaler" Menge auf.

Dieses späte Auftreten des Genproduktes 2 und das ebenso plötzliche Verschwinden dieses bei Mutante Nr. 39 neu in Erscheinung getretenen Proteins könnten darauf deuten, daß diese am 16-Mutante eine weitere Mutation aufweist. Es wäre durchaus möglich, daß dieses neu auftretende Protein eine Vorläuferstruktur des Genproduktes 2 oder jedes beliebigen anderen Proteins darstellt, die im Verlauf der Phagenreifung erst in das endgültige Genprodukt geschnitten werden muß. Durch das späte Auftreten des Genproduktes 2 beim Vergleich der Proteinauftrennungen der 30 min- und 45 min-Entnahme der Mutante Nr. 39 liegt die Vermutung allerdings nahe, daß es sich bei diesem neu auftretenden Protein um eine Vorläuferstruktur des Genproduktes 2 handelt.

Zwar ist dieses Protein auch bei den Mutanten am 8 am 13 und am 13, die als Vergleichsgrundlage dienen, vorhanden, was bedeuten kann, daß diese Vorläuferstruktur auch bei den anderen Phagemutanten des Phagen P22 vorkommt, jedoch ist bei der Mutante Nr. 39 auffällig, daß zumindest soviel von diesem Protein nach der 30 min-Entnahme unter den gegebenen Versuchsbedingungen verschwindet, daß die 45 min-Entnahme keine Proteinbande mehr aufweist.

Auf den Abbildungen 8 und 9 sind zwischen den Banden der Genprodukte 5 und 8 (Molekulargewichte 55.000 d bzw. 42.000 d) drei weitere Banden zu erkennen, die auch Susskind und Rotstein (1978) gefunden haben. Sie identifizierten diese Proteine als Genprodukt 12 (54.000 d), Genprodukt 20 (50.000 d) und Genprodukt int (46.000 d). Diese Molekulargewichte konnten durch die Auswertung der Abbildungen 8 und 9 bestätigt werden.

2.4 Versuch zur Identifizierung von Genprodukt 19

In der Literatur (Susskind und Potstein, 1978) wurde dem Genprodukt 19 bisher nur durch enzymatische Aktivität ein Molekulargewicht von 20.000 d zugeordnet. In SDS-Polyacrylamid-Gelen konnte es bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein Zellextrakt am 19-infizierter Zellen elektrophoretisch aufgetrennt. Das Fandenmuster dieses am 19-infizierten Zellextraktes nach der Auftrennung in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel gibt die Abbildung 10 wieder.

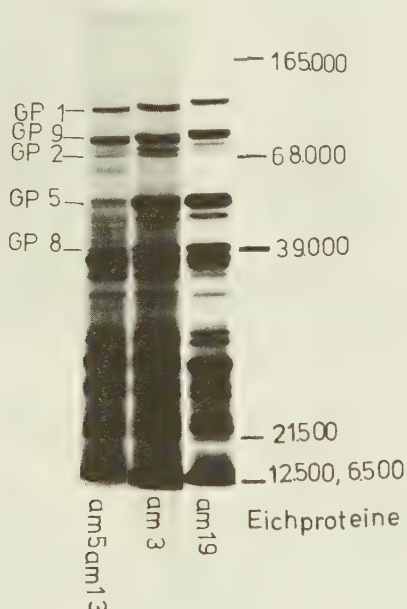


Abbildung 10: Fandenmuster verschiedener Phagenmutanten in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel.

Aus Vergleichsgründen wurden ebenfalls die Fandenmuster einer am 3- bzw. am 5-Mutante abgebildet. Die Positionen der mitgelaufenen Eichproteine wurden zur besseren Abschätzung der Molekulargewichte in die Abbildung eingezeichnet. Die Proteinauftrennung der Mutante am 19 weist in dem Bereich der Molekulargewichte von 20.000 d eine geringere Schwärzung auf, als bei den Mutanten am 3 und am 5 zu erkennen ist. Die schwache Bande in diesem Bereich könnte von intakten Proteinmolekülen verursacht worden sein, die trotz der

am-Mutation dieses Gens gebildet worden sind. Diese Eigenart der am-Mutanten wird als "leakiness" bezeichnet. Sollte dies auf die benutzte am 19-Mutante zutreffen, so wäre das Genprodukt 19 durch sein teilweises Fehlen in der Proteinauftrennung in einem SDS-Polyacrylamid-Gel nachgewiesen worden.

2.5 Veränderungen des Bandenmusters bei den Transduktionsmutanten

Die Transduktionsmutanten HT und NT des Phagen P22 verpacken DMS mit unterschiedlicher Spezifität. Alle HT- und NT-Mutanten wurden nach dem Mutagenisieren der Phagen mit Nitrosoguanidin (N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin) isoliert (Schmieger, 1971,b).

Die Mutationsorte der zwei Transduktionsmutanten HT 12/4 und HT 13/4 wurden kartiert und in oder bei dem Gen 3 lokalisiert. Der Mutationsort des Stammes NT 12/1 befindet sich in oder bei dem Gen 1, der der Mutante NT 1/1 in der Region zwischen den Genen 19 und 3 und der der Mutante NT 6/2a im Bereich der Gene 5 oder 8 (siehe Abbildung 1). Diese Kartierungen wurden durchgeführt von Raj, Raj und Schmieger (1974).

Durch einen Vergleich der elektrophoretischen Auftrennung der Proteinextrakte dieser Transduktionsmutanten mit dem Bandenmuster des Wildtyps konnte untersucht werden, ob die unterschiedliche Transduktionseigenschaft mit einem sichtbar veränderten Protein in Zusammenhang steht.

Bei der Betrachtung der Abbildung 11 fällt auf, daß die elektrophoretische Auftrennung des Proteinextraktes der Transduktionsmutante HT 12/4 ein etwas anderes Bandenmuster liefert, als bei der Auftrennung der Proteinextrakte der anderen Phagen zu sehen ist. Die bisher nicht identifizierte Bande "y" des Phagen HT 12/4 ist schneller geworden. Damit besitzt das zugehörige Protein ein kleineres Molekulargewicht als das der vergleichbaren Proteine der anderen Transduktionsmutanten und des (in bezug auf die Transduktionseigenschaft) Wildtypphagen H5.

Eine Veränderung des Genproduktes 3, das aufgrund der Kartierung mit großer Wahrscheinlichkeit den HT-Phänotyp bedingt, kann bei dieser Proteinauftrennung nicht festgestellt werden. Es wandert mit einem Molekulargewicht von 9.500 d (Susskind und Fotstein, 1978) zusammen mit anderen Proteinen kleineren Molekulargewichtes in der Lauforder der Proteine. Die Trennstrecke und die Acrylamidkonzentration waren zu gering um auch die "kleinen" Proteine aufzutrennen.

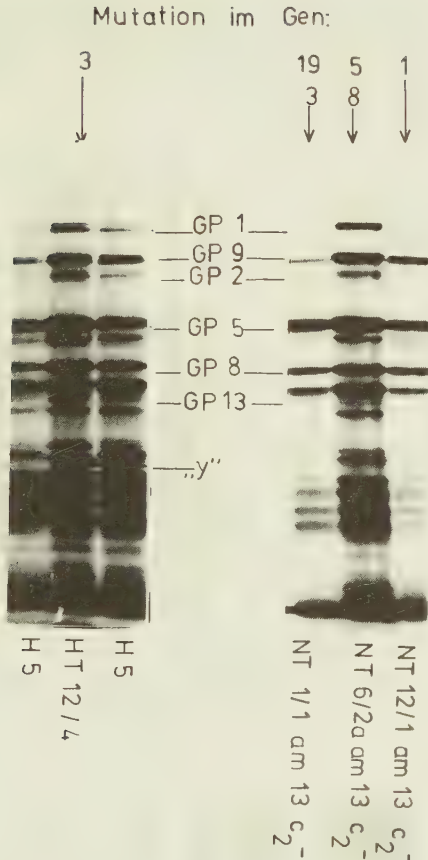


Abbildung 11: Vergleich der Bandenmuster von Zellextrakten, die mit Transduktionsmutanten oder dem Transduktionswildtyp H5 infiziert waren, in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel.

Auf der Abbildung 11 ist weiterhin zu erkennen, daß bei der Mutante NT 12/1 am 13 c₂⁻ das Genprodukt 1 im Vergleich mit dem der anderen Mutanten in geringerer Menge vorliegt. Auch das Genprodukt 2 dieser Mutante bildet eine schwächere Bande als dies bei den anderen Proteinauftrennungen der Fall ist. Jedoch scheint diese Mutante – auch wenn man in Betracht zieht, daß weniger Protein insgesamt zur Auftrennung verwendet wurde – weniger Genprodukt 1 zu bilden als die anderen Mutanten. Dies kann man behaupten, wenn man die Annahme zugrunde legt, daß die Markierung der verschiedenen Genprodukte mit ¹⁴C-markierten Aminosäuren gleich effektiv

war. Die vorliegende Menge der Proteine läßt sich dann durch den Grad der Belichtung des Röntgenfilmes festlegen. Ist viel Protein von einer Sorte vorhanden, so ist die entsprechende Bande kräftig schwarz. Liegt weniger Protein vor, ist die Bande mehr als grauer Strich zu erkennen.

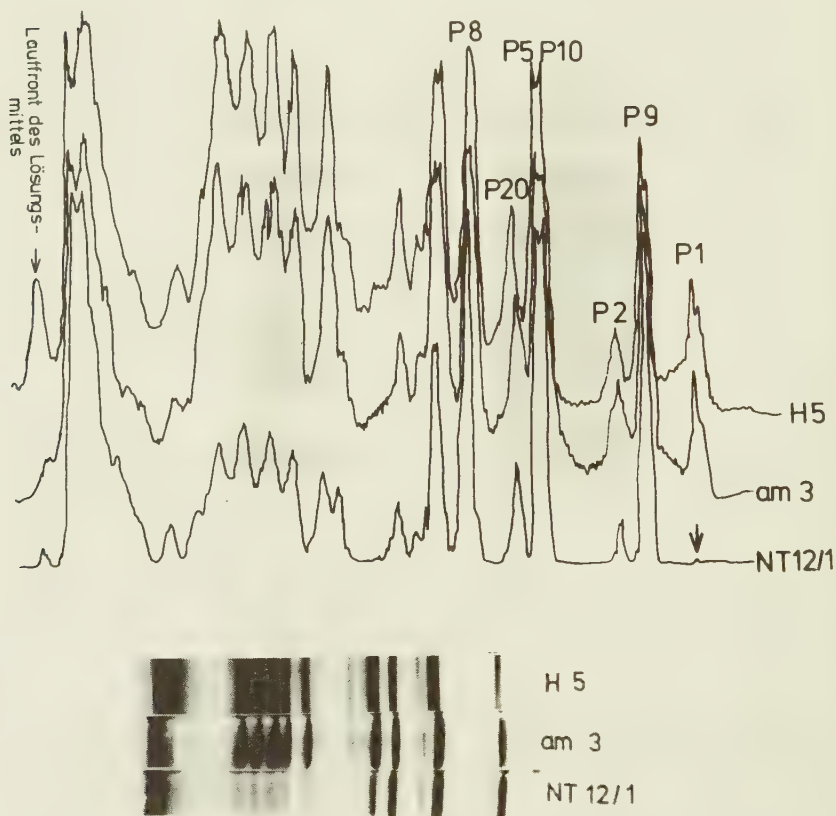


Abbildung 12: Densitometrische Auswertung von elektrophoretischen Auftrennungen mehrere Zellextrakte, die mit verschiedenen Mutanten des Phagen P22 infiziert waren. Die Zellextrakte waren in 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt worden.

Deutlicher zu erkennen ist dies auf der Abbildung 12, die eine densitometrische Auswertung verschiedener Mutanten des Phagen P22 wiedergibt. Die graphische Darstellung der Proteinauftrennungen, die bei allen drei Densitogrammen gut

Übereinstimmt, zeigt bei der Mutante NT 12/1 am 13 c₂⁻ da, wo das Genprodukt 1 zu erwarten ist, nur einen minimalen Ausschlag. Bei den Mutanten am 3 und H5 ist hingegen zu sehen, daß das Gen-1-Produkt in vergleichbarer Menge vorhanden ist. Dies bedeutet, daß die Mutante NT 12/1 am 13 c₂⁻ kein bzw. sehr viel weniger Genprodukt 1 herstellt. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Kartierung des Mutationsortes dieses Phagen im Bereich des Genes 1.

2.6 Kreuzungen von Rekombinanten zwischen der Transduktionsmutante HT 12/4 und DE-Stämmen

Die Transduktionsmutante HT 12/4 überträgt mit erhöhter Häufigkeit bakterielle DNS von einem Spenderbakterium auf einen Empfänger. Der Mutationsort kartiert im Bereich des Genes 3.

Um nun zu überprüfen, ob die HT-Eigenschaft des Phagen HT 12/4 allein von der Mutation im Bereich des Genes 3 hervorgerufen wurde, oder ob eine weitere Mutation im Genom dieser Mutante (Abbildung 11, Bande "y") verantwortlich ist, wurden Rekombinanten hergestellt, die in bezug auf die Transduktionshäufigkeit wieder Wildtypeigenschaft aufwiesen.

Normalerweise wird für die Durchführung einer solchen Rekombination eine Bakterienzelle mit der zu analysierenden Phagenmutante und einer weiteren Mutante, die den geforderten Genotyp aufweist, mischinfiziert. Die nach Lyse der Bakterienzelle freigesetzten Phagen werden dann durch Tests auf den Genotyp geprüft und eine Rekombinante des gewünschten Typs isoliert.

In diesem Fall wurde diese Art der Kreuzung umgangen, indem lysogene Salmonella-Zellen infiziert wurden. Bei diesen liegt die DNS des Phagen P22 als Prophage zwischen den bakteriellen Genen proA und proC in integrierter Form vor. Einige lysogene Stämme weisen Deletionen in dem Genom des Prophagen auf und zwar sowohl von der Seite des proA-Genortes aus, als auch von der Seite des proC-Genortes. Diese sogenannten DE-Stämme (nach D. Botstein) sind kartiert. Es liegt also fest, welcher Stamm eine Deletion vom proC-Genort aus besitzt (bzw. vom proA-Genort), und wie weit diese Deletion in den Prophagen hineinreicht. Nimmt man nun einen dieser DE-Stämme, der im Prophagen noch das Gen 3 besitzt und infiziert diesen Stamm mit der Transduktionsmutante HT 12/4, so kann durch rekombinativen Austausch des Gen-3-Ortes eine Rekombinante von HT 12/4 erhalten werden, die hinsichtlich der Transduktion wieder Wildtypeigenschaft aufweist.

In dem Kreuzungsansatz zur Gewinnung von Rekombinanten wurden zwei unterschiedliche DE-Stämme verwendet, nämlich die Stämme DB 122 und DE 5064. Die Abbildung 13 gibt die

Genkarte des Prophagen P22, sowie die in den Prophagen hineinreichenden Deletionen der beiden DP-Stämme 122 und 5064 wieder.

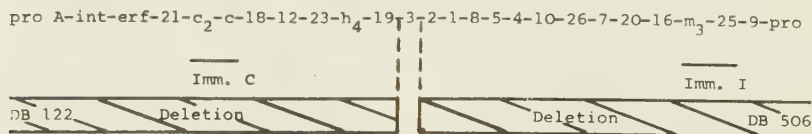


Abbildung 13: Genkarte des Prophagen P22 und Deletionen im Prophagenom der lysogenen Stämme DP 122 und DP 5064

Die Deletion des DP-Stammes 122 schließt die Prophagengene int bis 19 ein. Das Gen 3 ist vollständig erhalten. Der DP-Stamm 5064 weist eine Deletion auf, die vom Prophagen 9 bis zum Gen 2 reicht, wobei das Gen 3 ebenfalls noch vollständig vorhanden ist.

Die auf diesen beiden Stämmen gezogenen Lysate des Phagen HT 12/4 waren ein Gemisch der verschiedensten Phagenmutanten, die durch Rekombination mit den Prophagenresten entstanden sind und natürlich auch des Elterntyps HT 12/4. Um die Rekombinanten zu finden, die in bezug auf die Transduktionseigenschaften Wildtyp geworden waren, wurden mehrere Einzelplaques von der Titerplatte abisoliert und auf dem alysogenen Bakterienstamm LT-2 vermehrt. Mit diesen so gewonnenen Phagenlysaten wurden Transduktionen durchgeführt und die Transduktionshäufigkeiten für mehrere Marker bestimmt.

Als Empfängerstämme der Transduktionen dienten die lysogenen Bakterienstämme SA 4(H1), der leu^- ist, Trp-8(H1), der trp^- ist und der Stamm TLara(H1), der sowohl leu^- als auch thr^- . Bei Verwendung des Stammes TLara(H1) wurde der Minimalplatte entweder Leucin zugesetzt, wenn die Transduktion des Markers Threonin geprüft werden sollte, oder aber es wurde der Minimalplatte Threonin zugesetzt, wenn die Transduktionshäufigkeit des Markers Leucin geprüft werden sollte. Diese Stämme wurden vor der Transduktion auf Rückmutanten geprüft und deren Anzahl bei der Auswertung berücksichtigt.

Ein Maß dafür, ob der zu prüfende Phage in bezug auf die Transduktion Wildtypeigenschaft aufweist, oder aber eine erhöhte Transduktion vorliegt, ist das T/P-Verhältnis für verschiedene Marker. In der Literatur (Schmieger, 1972; Schmieger und Packhaus, 1976) sind die in Tabelle 4 dargestellten T/P-Werte für die Marker Leucin, Threonin und Tryptophan angegeben. Der Unterschied der T/P-Verhältnisse bei den verschiedenen Phagenmutanten beträgt also immer mehrere Zehnerpotenzen bei den untersuchten Markern.

Tabelle 4: T/P-Verhältnisse der Phagen H5 und HT 12/4 für verschiedene transduzierte Marker
(Schmieger, 1972; Schmieger und Backhaus, 1976)

Phage	T/P-Verhältnisse für die Marker			
	leu-39	trp-8	thr-47	leu A-124
H5	$5,1 \times 10^{-8}$	$3,9 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-7}$	$4,3 \times 10^{-7}$
HT 12/4	$3,6 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-5}$	$5,3 \times 10^{-4}$

Aus den verschiedenen Kreuzungsansätzen zur Gewinnung von Rekombinanten zwischen den DB-Stämmen 122 und 5064 einerseits und der Phagenmutante HT 12/4 andererseits konnten drei Rekombinanten isoliert werden. Die T/P-Verhältnisse dieser drei Rekombinanten sind in der Tabelle 5 im Vergleich zum "Wildtyp" H5 wiedergegeben.

Tabelle 5: T/P-Verhältnisse der erhaltenen Rekombinanten und der Phagenmutante H5

Phage	Kreuzung zwischen	Plaques	T/P-Verhältnisse für die Marker			
			leuA-124 SA 4(H1)	trp-8 Trp-8(H1)	thr-47 TLara(H1)	leu-39
RM 11	HT 12/4 x	klar	$1,4 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-7}$	$2,9 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^{-6}$
	DF 122	groß				
RM 15	HT 12/4 x	klar	$2,5 \times 10^{-6}$	$3,9 \times 10^{-7}$	$6,5 \times 10^{-6}$	$8,5 \times 10^{-6}$
	DB 5064	klein				
RM 18	HT 12/4 x	trüb	$3,0 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-7}$	$4,1 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-6}$
	DB 5064	groß				
H5				$3,0 \times 10^{-7}$	$5,7 \times 10^{-7}$	$2,0 \times 10^{-7}$

Die T/P-Werte des trp-Markers, welche durch die Phagenrekombinanten RM 11, RM 15 und RM 18 erhalten wurden, stimmen sehr gut mit dem Wert überein, der in der Literatur für die Transduktion dieses Genes durch den Phagen H5 angegeben ist. Als Kontrolle wurde auch parallel zu den Transduktionen der Rekombinanten die Transduktion des trp-8-Genes durch den Phagen H5 mit untersucht. Auch dieser T/P-Wert stimmt mit denen der Rekombinanten überein. In bezug auf die Transduktion des trp-8-Markers haben also die Rekombinanten die Eigenschaft des Phagen HT 12/4, nämlich das trp-8-Gen sehr viel häufiger zu transduzieren als der Klarplaquephage H5, verloren. Für die Marker leu-39, leu A-124 und thr-47 zeigen die Rekombinanten RM 11, RM 15 und RM 18 T/P-Werte, welche zwischen den Transduktionshäufigkeiten der Phagen HT 12/4 und H5 liegen. Die T/P-Ver-

hältnisse der drei Rekombinanten sind zwar um ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als bei der ursprünglichen HT-Mutante, erreichen aber die Wildtypwerte von H5 nicht ganz.

Das Transduktionsverhalten dieser drei Rekombinanten könnte darauf hinweisen, daß an der Transduktion noch eine weitere Funktion (außer dem Gen-3-Produkt) beteiligt ist, die Marker-spezifisch reagiert und nicht durch die Kreuzungsansätze zur Wildtypeigenschaft rekombiniert werden konnte.

Von diesen drei Rekombinanten wurden ^{14}C -markierte Proteinextrakte hergestellt und über SDS-Polyacrylamid-Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Proteinauftrennungen waren aber jeweils nur bei den Rekombinanten R^{M} 15 und R^{M} 18 auswertbar. Beim Vergleich der Pandenmuster dieser beiden Rekombinanten mit dem Pandenmuster des Phagen H5 (Abbildung 14) konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

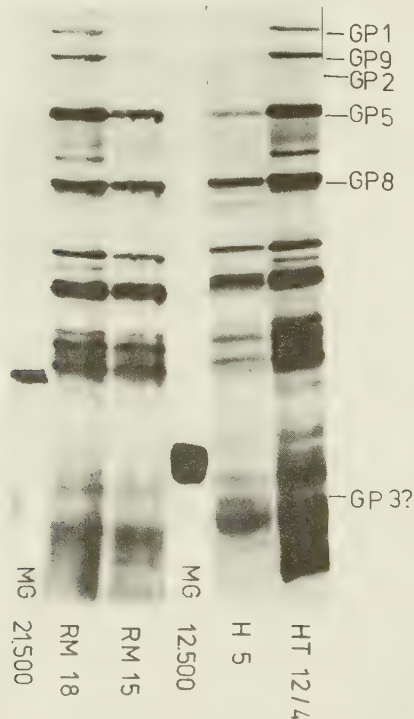


Abbildung 14: Vergleich von elektrophoretisch aufgetrennten Zellextrakten, die mit verschiedenen Phagenmutanten bzw. den Rekombinanten R^{M} 15 und R^{M} 18 infiziert waren. Die Proteine wurden in 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelele aufgetrennt.

Falls das Finkreuzen des Wildtypgenes 3 in die Phagenmutante HT 12/4 erfolgreich war, könnte dies bei den Rekombinanten R^M 15 und R^M 18 eine "Normalisierung" des Pandemusters mit sich gebracht haben. Geht man davon aus, daß das Molekulargewicht des Genproduktes 3 9.500 d beträgt, so fällt in der Proteinauftrennung (Abbildung 14) in diesem Molekulargewichtsbereich nur ein Protein aus, welches das Genprodukt 3 darstellen könnte. Von der Vermutung ausgehend, daß dieses fehlende Genprodukt mit dem Genprodukt 3 identisch ist, scheint es aber in den Rekombinanten wieder vorhanden zu sein, wie dies auch beim "Wildtyp" H5 zu erwarten ist.

Durch die Proteinauftrennungen dieser Mutanten kann man annehmen, daß die Veränderung in dem Transduktionsverhalten des Phagen HT 12/4 durch die Mutation im Gen 3 verursacht wird, da auch der Mutationsort dieser Mutante im Gen 3 kartiert worden ist (Raj, Raj und Schmieger, 1974).

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß die Identifizierung der Phagenproteine mittels der elektrophoretischen Auftrennung nicht immer absolut eindeutige Ergebnisse gebracht hat. Es ist wahrscheinlich, daß das Genprodukt 13 ein Molekulargewicht von 38.000 d oder etwas kleiner besitzt (Abbildung 7). Das schneller wandernde Protein des Phagen am 9 konnte hingegen nicht identifiziert werden, es ist jedoch nicht auszuschließen, daß es sich bei diesem Protein um das am 9-Fragment handelt.

Auf der Abbildung 8 ist zu erkennen, daß das Genprodukt 2 größer sein muß als das Genprodukt 16. Um zu überprüfen, ob dieses Ergebnis stimmt, wurden zwei Extrakte von Zellen, die mit unterschiedlichen am 16-Mutanten infiziert waren, elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 9). Dabei sollte nicht untersucht werden, wann welches Protein auftaucht - dafür sind die Abstände der einzelnen Entnahmen zu groß -, sondern ob das Genprodukt 16 tatsächlich ein kleineres Molekulargewicht hat als das Genprodukt 2, denn dies wäre eine Umkehrung der diesen Proteinen zugeordneten Größe. Dies scheint nach den zu dieser Arbeit gemachten Proteinauftrennungen in der Tat der Fall zu sein.

Dem Genprodukt 19 wurde bisher aufgrund enzymatischer Bestimmungen ein Molekulargewicht von 20.000 d zugeordnet (Susskind u. Botstein, 1978). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach dem Ausfall eines Proteins in diesem Bereich bei einer am 19-Mutante gesucht. Die Wiedergabe der elektrophoretischen Proteinauftrennungen dieser Mutante in der Abbildung 10 könnte diese Angabe stützen. Eine eindeutige Aussage ist aber erst dann möglich, wenn die entsprechenden Proteine isoliert und biochemisch untersucht worden sind.

Die in den Abbildungen 11 und 12 gezeigten Proteinauftrennungen stützen die Partierungsergebnisse der Mutante NT 12/1 am 13 c₂⁻. Bei dieser Mutante soll der Mutationsort im Gen 1 liegen. Die elektrophoretische Auftrennung zeigt,

daß diese Mutante nur sehr geringe Mengen an Genprodukt 1 synthetisiert.

Die Transduktionsmutante HT 12/4 trägt eine Mutation im Gen 3. In welcher Weise diese Mutation, die auch für das veränderte Transduktionsverhalten dieser Mutante verantwortlich ist, das Genprodukt 3 verändert hat, konnte nicht geklärt werden. Es zeigte sich aber (Abbildung 14), daß die Rekombinanten des Phagen HT 12/4 - ebenso wie der "Wildtyp-phage" H5 - eine Bande im Bereich der kleinemolekularen Proteine aufweisen, die dem Phagen HT 12/4 zu fehlen scheint. Möglicherweise besitzt die Mutante HT 12/4 noch eine zweite Mutation, deren Mutationsort aber bisher noch nicht kartiert werden konnte. Darauf könnte die schnellere Bande "y" (Abbildung 11) hindeuten. Desweiteren konnten die T/P-Werte des Phagen H5 von den Rekombinanten RM 11, RM 15 und RM 18 für die Marker leu-39, leu A-124 und thr-47 nicht voll erreicht werden.

3. Versuch zur Identifizierung des DNS-Protein-Komplexes über Sucrosegradienten

Wie von Gough et al. (1975) und Schumann et al. (1976) gezeigt wurde, treten im Verlauf der Phagenreifung Proteine zu einem späten Zeitpunkt auf, die Bindungsaktivität an DNS aufweisen. Ein Teil der vorliegenden Arbeit war der Versuch, die Phagenproteine zu identifizieren, die nach Phageninfektion synthetisiert werden und mit DNS einen Komplex bilden können.

Um untersuchen zu können, für welche Proteine diese Bindungsaktivität sowohl an Phagen-DNS als auch an Bakterien-DNS nachgewiesen werden kann, wurden erst Phagenmutanten gesucht, die zu dem c^+ - bzw. c_2^- -Genotyp noch eine weitere Mutation im Gen 13 enthielten. Diese Mutanten konnten durch Kreuzungen der beiden Ausgangspartner c^+ bzw. c_2^- und am 13 erhalten werden.

Die Mutation am 13 betrifft, wie bereits erwähnt, eine zur Lyse der Bakterienzellen notwendige Funktion. Durch das Ausfallen dieses Genproduktes können die reifen Phagen die Bakterienzelle nicht mehr selbständig lysieren. Die Proteine, die nach Phageninfektion synthetisiert werden, bleiben in der Bakterienzelle. Sie können durch Abzentrifugieren der Bakterien und Aufnehmen in einem kleineren Volumen stark konzentriert werden, bevor die Bakterienzellen von außen aufgebrochen werden.

Wie früher gezeigt werden konnte (Buch, Diplomarbeit, 1974), traten bei Sucrosegradienten, auf die ein Extrakt P22-infizierter Zellen aufgetragen wurde, schnell sedimentierende Peaks bakterieller DNS auf. Diese wurden durch CsCl-Kissen am Pelletieren gehindert. Wenn die Proben vor

der Zentrifugation jedoch deproteinisiert worden waren, also entweder nach Behandlung mit puffergesättigtem Phenol oder aber mit Pronase, verschwanden die Peaks der schnell sedimentierenden bakteriellen DNS. Mit der Abnahme dieser Peaks ging eine Zunahme der Phagen-DNS von 8-10 facher Phagenomlänge (ca. 300 Millionen d) einher.

Aus diesen Befunden könnte also geschlossen werden, daß es sich im ersten Fall um Protein-DNS-Komplexe gehandelt haben könnte, die in Sucrosegradienten eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit haben als reine DNS. Von dieser Überlegung ausgehend, sollte versucht werden, Protein-DNS-Komplexe im Sucrosegradienten von den nicht an DNS bindenden Proteinen eines Zellextraktes zu trennen. Den auf diese Weise isolierten Protein-DNS-Komplexen sollte dann DNase zugesetzt werden, um die DNS zu verdauen. Die zurückgebliebenen radioaktiv-markierten Proteine sollten dann über SDS-Polyacrylamid-Gele identifiziert werden.

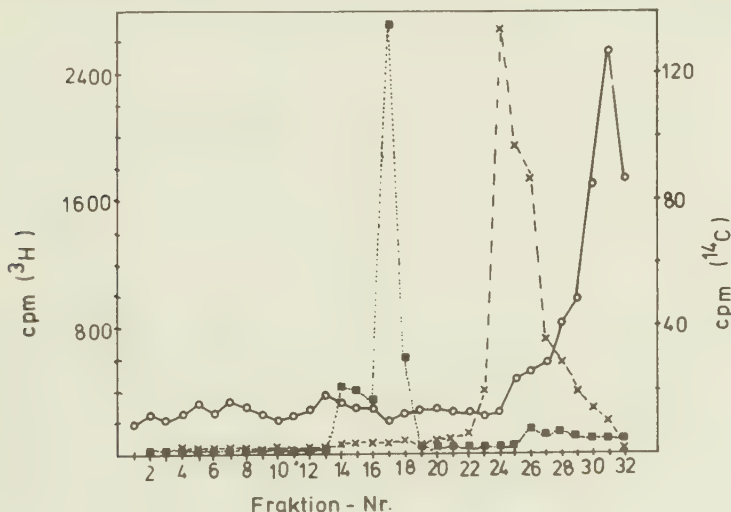


Abbildung 15: Sedimentationszentrifugation von bakterieller DNS, Phagen-DNS und Proteinen aus einem Extrakt HT 12/4 am 13 C_2^- -infizierter Zellen in einem neutralen linearen 5-20 %igen Sucrosegradienten, mit CsCl -Kissen. Laufbedingungen: Rotor SW 50.1, 25.000 rpm, 3 h, 23°C.

■ — ■ ^3H -markierte bakterielle DNS,
 x — x ^3H -markierte Phagen-DNS,
 ○ — ○ ^{14}C -markierter Extrakt HT 12/4 am 13 C_2^- -infizierter Zellen.

Die Abbildung 15 zeigt die Zentrifugation von gereinigter Salmonella-DNS, gereinigter Phagen-DNS und einem Protein-

extrakt aus HT 12/4 am 13 c_2^- -infizierten Zellen, die auf drei verschiedene Gradienten aufgetragen waren. Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit ist deutlich sichtbar. Die bakterielle DNS hat mehrfache Phagenenomlänge und wandert daher schneller als die Phagen-DNS, während der Peak des Proteinextraktes kaum in den linearen neutralen Gradienten eingedrungen ist.

Hier kann kein Peak schnell sedimentierender bakterieller DNS erwartet werden, wie dies in der Diplomarbeit der Fall war, da die Zentrifugationen zu Vergleichszwecken mit gereinigter (deproteinisierter) DNS durchgeführt wurden.

Nachdem durch diese drei in Abbildung 15 gezeigten Gradienten bestätigt war, daß sowohl die beiden DNS-Arten als auch der Extrakt infizierter Zellen eine unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit zeigten, wurden daraufhin Proben des Proteinextraktes infizierter Zellen mit Salmonella-DNS bzw. Phagen-DNS vermischt, um DNS-Protein-Komplexe zu erhalten.

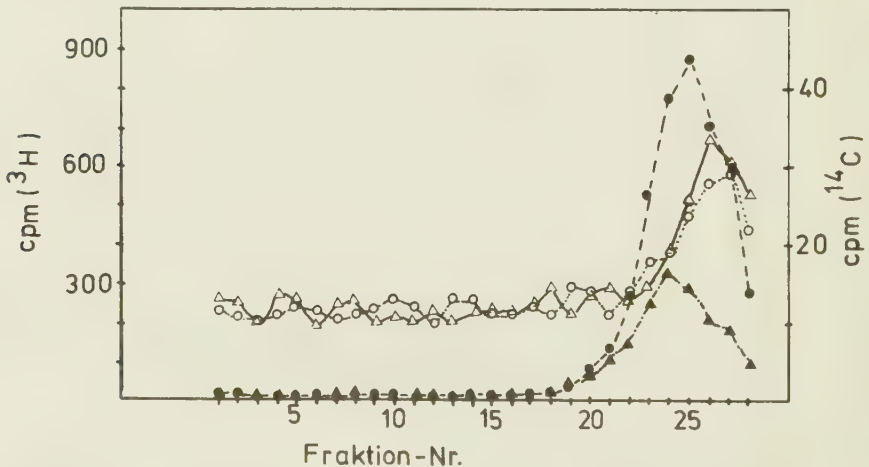


Abbildung 16: Sedimentationsverhalten von ^3H -markierter DNS und ^{14}C -markierten Proteinen aus Reaktionsmischungen in einem neutralen linearen 5-20 %igen Sucrosegradienten, der ein CsCl -Kissen enthält.

Laufbedingungen: Rotor SW 50.1, 25.000 rpm, 3 h, 23°C .

▲----▲ ^3H -markierte bakterielle DNS in dem Reaktionsansatz mit ▲----▲ ^{14}C -markierten Proteinen HT 12/4 am 13 c_2^- -infizierter Zellen und ●----● ^3H -markierter Phagen-DNS in dem Reaktionsansatz mit ○-----○ ^{14}C -markierten Proteinen HT 12/4 am 13 c_2^- -infizierter Zellen.

In dem Extrakt infizierter Zellen waren 900 µg/ml Protein enthalten. Die Proteinmessung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951). Der Bindungstest wurde nach der Vorschrift von Echols und Green (1971) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ist in Kapitel 4.1 beschrieben. Der Reaktionsansatz durfte 5 min im Eisbad inkubieren. Von diesem Reaktionsgemisch wurden 200 µl auf einen linearen neutralen 5-20 %igen Sucrosegradienten aufgetragen und zentrifugiert. Die Abbildung 16 zeigt die Sedimentationsprofile der einzelnen Komponenten aus den Ansätzen ¹⁴C-markierter Extrakt Phagen-infizierter Zellen plus ³H-markierter Salmonella-DNS bzw. plus ³H-markierter Phagen-DNS.

Das Ergebnis dieser Zentrifugation ist nicht ganz eindeutig zu erklären, da sowohl die Bakterien-DNS als auch die Phagen-DNS langsamer wandern als in den Proben, die reine DNS enthalten. Allerdings erscheint von beiden DNS-Arten ein gut erkennbarer Peak und kein Anstieg von ³H-Aktivität in den letzten Fraktionen, was auf einen völligen Abbau der DNS in Nukleotide hinweisen würde.

Es besteht auch die schwache Möglichkeit, daß in dem Proteinpeak neben Abbauprodukten Komplexe enthalten sind. Da in die Sedimentation von Strukturen ja nicht nur das Molekulargewicht eingeht, sondern auch die Konformation, wäre es denkbar, daß netzartige Verknüpfungen zwischen DNS und Proteinen entstehen, welche zu langsamerer Sedimentation führen. Solche Komplexe müßten jedoch von anderer Art sein als die, welche in der Diplomarbeit beschrieben sind.

Um jedoch auch diese Möglichkeit zu prüfen, wurde daher ein weiterer Versuch unternommen, die eventuell vorhandenen Protein-DNS-Komplexe durch verschärfte Zentrifugationsbedingungen von dem Proteingemisch Phagen-infizierter Zellen zu trennen. Auf drei 5-20 %ige Sucrosegradienten wurden verschiedene Proben aufgetragen. Auf einen Gradienten wurden 200 µl Extrakt Phagen-infizierter Zellen aufgetragen, auf einen zweiten 200 µl Reaktionsgemisch, das Protein-Extrakt und Phagen-DNS enthielt und auf einen dritten Gradienten wurden 200 µl Reaktionsansatz aufgetragen, der Protein-extrakt und Salmonella-DNS enthielt. Die Zentrifugation erfolgte 14h mit 35.000 rpm im SW 65.1-Rotor in der Erwartung, daß mögliche Protein-DNS-Komplexe dann weiter vom Meniskus weg wanderten als dies auf der Abbildung 16 zu erkennen ist.

Das Ergebnis dieser erneuten Sedimentationszentrifugation ist in Abbildung 17 zu sehen. Selbst unter diesen Zentrifugationsbedingungen konnte keine Trennung der Protein-DNS-Komplexe von dem Extrakt Phagen-infizierter Zellen gezeigt werden, falls diese Komplexe gebildet wurden.

Eine Erklärung dafür, daß zwar unter den in der Diplomarbeit eingehaltenen Bedingungen Komplexe entstanden, nicht aber im hier beschriebenen in-vitro-Ansatz, dürfte darin zu

suchen sein, daß diese Komplexe notwendigerweise im Verlauf der Phagenreifung entstehen. Die physiologischen Bedingungen der in-vitro-Reaktion sowie die eventuell entscheidenden strukturellen Voraussetzungen (z.B. replizierende DNS-Formen) können nicht vollständig in den in-vitro-Ansätzen simuliert werden. Andererseits ist eine Wiederholung des in-vitro-Experimentes im Zusammenhang mit der jetzigen Fragestellung nicht sinnvoll, da es keine differentielle Markierung von Phagenproteinen, Phagen-DNS und bakterieller DNS erlaubt.

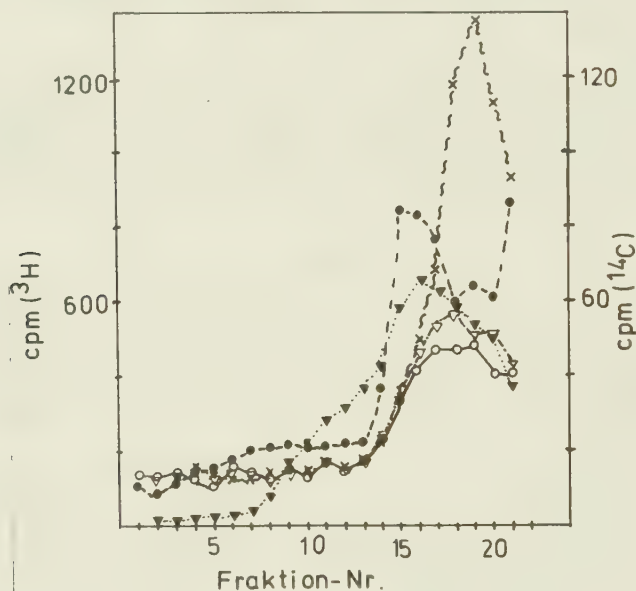


Abbildung 17: Sedimentationsverhalten von einem Extrakt Phagen-infizierter Proteine, Salmonella-DNS in einem Reaktionsansatz mit Proteinextrakt, sowie Phagen-DNS in einem Reaktionsgemisch mit Extrakt Phagen-infizierter Zellen in einem 5-20 %igen linearen neutralen Sucrosegradienten mit CsCl-Kissen.

Laufbedingungen: Rotor SW 65.1, 35.000 rpm, 14h, 5°C.

x---x ^{14}C -markierter Extrakt HT 12/4 am 13 c₂⁻-infizierter Zellen, ▼ ^3H -markierte Salmonella-DNS in einem Reaktionsansatz mit ▼ ^{14}C -markierten Proteinen und ● ^3H -markierte Phagen-DNS in einem Reaktionsgemisch mit ○ ^{14}C -markierten Proteinen.

Sollten sich jedoch unter den in Abbildung 17 beschriebenen Versuchsbedingungen Komplexe gebildet haben,

so sind die DNS-bindenden Proteine nicht durch Zentrifugation unter den hier angewandten Bedingungen aus dem Extrakt der Phagen-infizierten Zellen zu isolieren. Es mußte daher nach anderen Methoden gesucht werden.

4. Trennung von Proteinmischungen über Filterbindung

4.1 Methode der Filterbindung - allgemein

Die Bindung von Proteinen an DNS kann auch durch die Methode der Filterbindung nachgewiesen werden. Ein Proteinextrakt, dessen DNS-Bindungsaktivität gezeigt werden soll, wird mit radioaktiv-markierter DNS, an die die Proteine des Extraktes binden sollen, vermischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Reaktionsansatz über Nitrozellulosefilter (Membranfilter) abfiltriert und mit Puffer nachgewaschen (Echols u. Green, 1971; Jessel et al., 1975; Rouvière-Yaniv u. Gros, 1975; Schumann et al., 1976).

Bei dieser Methode der Filterbindung werden in der oben angegebenen Literatur radioaktiv-markierte DNS und nicht radioaktiv-markierte Proteinextrakte verwendet. Die native, nicht von Proteinen gebundene doppelsträngige DNS haftet nämlich nicht an dem Nitrozellulosefilter (FA 85 von Schleicher & Schüll), während der Protein-DNS-Komplex auf dem Filter nachgewiesen werden kann. Die Bindungsspezifität eines bestimmten Proteines an die angebotene DNS wird durch die Anzahl der gezählten radioaktiven Zerfälle bestimmt. Dabei liegen die auf die DNS-Bindungsfähigkeit zu untersuchenden Proteine entweder in gereinigtem Zustand vor (Echols u. Green, 1971; Rouvière-Yaniv u. Gros, 1975) oder aber als Proteinextrakt von Phagen-infizierten Zellen (Schumann u. Mitarbeiter, 1976). In der vorliegenden Arbeit sind dazu ähnliche Versuche durchgeführt worden.

Es wurden Extrakte am 13 c^+ - und am 13 c_2^- -infizierter Zellen (= Proteinextrakte) nach der Methode von Echols u. Green hergestellt, jedoch wurde hier der gesamte Proteinextrakt zum Filterbindungstest benutzt.

Zur Herstellung der Proteinextrakte infizierter Zellen wurden Phagemutanten benutzt, die eine am 13 -Mutation aufwiesen und damit, wie schon erwähnt, Lysis-defekt waren, was eine Anreicherung Phagen-eigener Proteine zur Folge hatte. Die Mutante c_2^- kann im Gegensatz zu c^+ -Wildtyp-Zellen nur lytisch infizieren und erhöht damit auch die Ausbeute an markierten Phagen-eigenen Proteinen. Desweiteren ist durch einen Vergleich der Bindungseigenschaften (Kapazitäten) von Extrakten am 13 c^+ - (Repressor anwesend) und am 13 c_2^- - (Repressor fehlt) infizierter Zellen eine Aussage darüber

möglich, wie groß die Bindungskapazität des Repressors an die angebotene DNS im Vergleich mit anderen Proteinen ist.

Die Reaktionsansätze sahen wie folgt aus:

- | | | |
|----|---|-------------------------|
| a) | 100 μ l Proteinextrakt | (Konz.: 900 μ g/ml) |
| | 100 μ l Bindungspuffer | |
| | 50 μ l 3 H-markierte Phagen-DNS | (Konz.: 30 μ g/ml) |
| b) | 100 μ l Proteinextrakt | (Konz.: 900 μ g/ml) |
| | 150 μ l Bindungspuffer | |
| | 10 μ l 3 H-markierte Bakterien-DNS | (Konz.: 160 μ g/ml) |

Zusätzlich zu diesen Filterbindungstests wurden noch folgende Kontrollen durchgeführt:

- | | | |
|----|---|-------------------------|
| c) | 100 μ l Proteinextrakt | (Konz.: 900 μ g/ml) |
| | 160 μ l Bindungspuffer | |
| d) | 210 μ l Bindungspuffer | |
| | 50 μ l 3 H-markierte Phagen-DNS | (Konz.: 30 μ g/ml) |
| e) | 250 μ l Bindungspuffer | |
| | 10 μ l 3 H-markierte Bakterien-DNS | (Konz.: 160 μ g/ml) |

Der Ansatz c) diente der Kontrolle der Background-Radioaktivität auf dem Filter von dem Proteinextrakt. Als Kontrolle und Backgroundmessung der Radioaktivität auf dem Filter von 3 H-markierter Phagen-DNS diente der Ansatz d), während für die Bakterien-DNS der Ansatz e) galt.

Die Ergebnisse dieser Filterbindung sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt. Die Reaktionsansätze von am 13 c^+ mit H5-DNS (V) und am 13 c^+ mit T4/2-DNS (VII) wurden als 100 %-Werte genommen, da in diesen Zellextrakten alle Phagen-eigenen Proteine (außer dem Genprodukt 13) vorhanden sein sollten. Beim Vergleich der Bindungsfähigkeit an Phagen-(H5-)DNS (V und VI) sieht man, daß die c_2^- -Proteine um 60,7 % bis 69,6 % niedriger liegen als die c^+ -Proteine. Dies zeigt den hohen Anteil des c_2^- -Repressors an der Gesamtheit der an Phagen-DNS bindungsfähigen Proteine. Gough et al. (1975) finden sogar, daß der Repressor bis zu 90 % beteiligt ist, was jedoch stark durch die physiologischen Bedingungen beeinflusst werden könnte.

Die Nichtrepressorproteine (VI) erreichen zwischen 5.405 und 6.091 cpm bei der Bindung des am 13 c_2^- -Extraktes an H5-DNS. Dieser Extrakt erreicht aber bei der Bindung an T4/2-DNS sehr viel höhere cpm-Werte (VIII) als der Extrakt am 13 c^+ -infizierter Zellen (VII).

Tabelle 6: Filterbindungsversuche von Extrakten am $13c^+$ - und am $13c_2^-$ -infizierter Zellen an Bakterien- und Phagen-DNS (gemessen wurden 3H -counts)

Bindungsansatz		Inkubationsbedingungen	
		5 min, 0°C	20 min, 0°C
KI	cpm vom vorbehandelten Filter, ohne DNS und ohne Proteine	112 *	
KII	cpm von H5-DNS auf dem Filter, ohne Proteine	8479 *	
KIII	cpm von T4/2-DNS auf dem Filter, ohne Proteine	9328 *	
I	cpm vom Bindungsgemisch H5-DNS / am $13c^+$	26281	23977
II	cpm vom Bindungsgemisch H5-DNS / am $13c_2^-$	13884	14570
III	cpm vom Bindungsgemisch T4/2-DNS / am $13c^+$	22401	24774
IV	cpm vom Bindungsgemisch T4/2-DNS / am $13c_2^-$	27399	25706
V	Bindungsfähigkeit vom Extrakt am $13c^+$ an H5-DNS (I - KII)	100 % =17802 cpm	100 % =15498 cpm
VI	Bindungsfähigkeit vom Extrakt am $13c_2^-$ an H5-DNS (II - KII)	30,4 % = 5405 cpm	39,3 % = 6091 cpm
VII	Bindungsfähigkeit vom Extrakt am $13c^+$ an T4/2-DNS (III - KIII)	100 % =13073 cpm	100 % =15446 cpm
VIII	Bindungsfähigkeit vom Extrakt am $13c_2^-$ an T4/2-DNS (IV - KIII)	138 % =18071 cpm	106 % =16378 cpm

*) Die in Tabelle 6 wiedergegebenen Werte KI, KII und KIII wurden nur einmal pro Versuch gemessen, da sich die Inkubationsbedingungen nicht auf das Einweichen der Filter in einer bestimmten Lösung beziehen, sondern auf die Zeitspanne und die Temperatur, bei denen die Proteinlösung mit der entsprechenden DNS-Art reagierte.

Input 3H -markierte H5-DNS = 73.506 cpm;

Input 3H -markierte T4/2-DNS = 58.268 cpm.

Da dem Extrakt am 13 c_2^- -infizierter Zellen ein Phagenprotein, das c_2 -Produkt (=Repressor) fehlt, sollte dieser Extrakt weniger Bindungsfähigkeit aufweisen als der Extrakt am 13 c_2^+ -infizierter Zellen. Beim Vergleich der Spalten VII mit VIII ist jedoch zu sehen, daß dieser Extrakt am 13 c_2^- -infizierter Zellen annähernd vergleichbar an T4/2-DNS bindet (VIII) wie der Extrakt, der das Repressorprotein enthält (VII).

Nachdem es sich bei den Bindungsversuchen an H5-DNS und T4/2-DNS jeweils um den gleichen Proteinextrakt gehandelt hat, kann man aus diesen Ergebnissen schließen, daß der c-Repressor nur an H5-DNS bindet, alle cpm an Salmonella-DNS aber von Nichtrepressorproteinen stammen. Die Erhöhung der Bindungsfähigkeit der Ansätze in den Spalten VII und VIII gegenüber den Spalten V und VI könnte durch die größere Zahl von akzeptierten Bindungsstellen auf der Salmonella-DNS erklärt werden, da die bakterielle DNS eine höhere Komplexität besitzt.

Weil der Background der 3H -markierten DNS (KII und KIII) auf den Nitrozellulosefiltern hoch erschien, wurden Versuche unternommen, den Background zu erniedrigen, indem einerseits die DNS zerkleinert wurde (Tabelle 7) und andererseits die Filter unterschiedlich vorbehandelt wurden (Tabelle 8).

Tabelle 7: Versuche zur Erniedrigung des Backgrounds der an Nitrozellulose gebundenen H5-DNS durch Zerkleinern der DNS. (Gemessen wurden 3H -counts)

Background des Filters		420 cpm
I	3H -markierte H5-DNS, ca. 1 Phagen genomlänge	39775 cpm = 26 %
II	3H -markierte H5-DNS, mechanisch zerkleinert	145992 cpm = 57 %
III	3H -markierte H5-DNS, ca. 1 Phagen genomlänge / Extrakt am 13 c_2^+ -infizierter Zellen	150378 cpm = 100 %
IV	3H -markierte H5-DNS, mechanisch zerkleinert / Extrakt am 13 c_2^+ -infizierter Zellen	253776 cpm = 100 %

Es wurden pro Ansatz 50 μl 3H -markierte H5-DNS verwendet und 100 μl eines Extraktes am 13 c_2^+ -infizierter Zellen.

Wie aus Tabelle 7 zu ersehen ist, wurde durch das mechanische Zerkleinern der DNS der Background der 3H -markierten H5-DNS nicht erniedrigt, sondern erhöht. Vergleicht man aber die Spalten I mit III und IV mit IV, bei denen es sich jeweils um eine gleich behandelte DNS mit bzw.

ohne einen Extrakt am 13 c⁺-infizierter Zellen handelt, so kann in beiden Fällen eine Erhöhung der ³H-counts festgestellt werden, wenn die DNS mit dem Extrakt am 13 c⁺-infizierter Zellen versetzt wurde. Es handelt sich bei den Ansätzen I und III um eine Erhöhung um das 3,8 fache und bei den Ansätzen II und IV um eine Erhöhung des Faktors 1,7.

Da die Anzahl der Bindungsstellen wegen der konstanten Menge DNS in allen vier Ansätzen aber gleich geblieben ist, kann aus dieser cpm-Steigerung der Ansätze III und IV geschlossen werden, daß sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen DNS-Protein-Komplexe gebildet haben.

Bei der vorliegenden Fragestellung, welche Phagen-co-dierten Proteine an DNS binden können, war es jedoch wenig hilfreich, wenn die DNS radioaktiv markiert war. Da eine Identifizierung der gebundenen Proteine durch Autoradiographie beabsichtigt war, sollten diese markiert eingesetzt werden. Vorversuche mit ¹⁴C-markierten Proteinen hatten jedoch ergeben, daß die Proteine unspezifisch an Nitrozellulosefiltern haften blieben. Es wurde daher zunächst der Versuch unternommen, die unspezifische Bindung der Proteine an die Membranfilter zu unterdrücken.

Dazu wurden Filter bei 23°C 30 min mit verschiedenen Lösungen inkubiert, die die Filter absättigen sollten. Diese unterschiedlich vorbehandelten Filter wurden dazu benützt, um gleiche Volumina entweder von Proteinextrakten oder aber von Reaktionsgemischen über diese Filter abzusaugen (Tabelle 8).

Wie die Ergebnisse zeigen, konnte die unspezifische Bindung der Proteine an die Nitrozellulosefilter durch vorhergehendes Einweichen in den Lösungen a, c und h (Spalte II) am besten unterdrückt werden. Die Haftung der Komplexe an die Filter wurde allerdings nach Vorbehandlung der Filter mit den Lösungen a, d und g (Spalte IV) extrem unterdrückt. Die Vorbehandlung der Filter nach den Inkubationsbedingungen h (Spalte IV) zeigt den größten Nettowert. Es blieben nach Komplexbildungsbedingungen 80,76 % des Inputs auf dem Filter zurück. Nach dieser Methode wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Filter vorbehandelt.

4.2 Trennung der Proteinmischung über Filterbindung

Die Proteine, die nach der Methode h (Tabelle 8) am Filter haften geblieben waren, sollten im weiteren Verlauf von den Filtern heruntergewaschen werden. Nach einer anschließenden elektrophoretischen Auftrennung der Proteine über ein SDS-Polyacrylamid-Gel sollte es möglich sein, die Proteine, die an DNS binden, zu identifizieren.

Tabelle 8: Versuche zur Herabsetzung unspezifischer Bindung von ^{14}C -markierten Proteinen eines Extraktes am 13 c $^{+}$ -infizierter Zellen an Nitrozellulosefilter. Gemessen wurden ^{14}C -counts. Pro Ansatz wurden 50 μl Proteingemisch zu je 23169 cpm eingesetzt.

I	II	III	IV
Lösungen, Inkubationsbedingungen	Filtration der ^{14}C -markierten Proteine	Filtration des Reaktionsansatzes H5-DNS/ ^{14}C -mark. Prot.	Komplexaktivität - netto in % vom input (I/II-JI)
a) 0,2 % BSA 30 min, 23°C	102 cpm	321 cpm	219 cpm = 0,95 %
b) 0,2 % Cytochrom c 30 min, 23°C	906 cpm	16115 cpm	15209 cpm = 65,64 %
c) 0,2 % Cytochrom c 0,2 % BSA, 30 min, 23°C	543 cpm	18824 cpm	18281 cpm = 78,90 %
d) 0,02 % BSA 30 min, 23°C	1054 cpm	2286 cpm	1232 cpm = 5,30 %
e) 0,02 % Cytochrom c 30 min, 23°C	1151 cpm	16658 cpm	15507 cpm = 66,90 %
f) 0,02 % Cytochrom c 0,02 % BSA, 30 min, 23°C	997 cpm	13155 cpm	12158 cpm = 52,50 %
g) Bindungspuffer nach Fehls u. Green 30 min, 23°C	1290 cpm	2067 cpm	777 cpm = 3,35 %
h) 1/10 mol/l Tris-HCl pH 7,4 + 1 % Pyrophos- phat, 30 min, 23°C	323 cpm	19037 cpm	18714 cpm = 80,76 %
i) H $_2$ O dest.	1032 cpm	12825 cpm	11793 cpm = 50,89 %

4.2.1 Herstellung von Extrakten Phagen-infizierter Zellen

Zur Optimierung der Filterbindung der Protein-DNS-Komplexe wurden zunächst Extrakte am 13 c₂⁻-infizierter Zellen nach verschiedenen Methoden gewonnen. Methode A beruhte auf der von Alberts et al. (1971) und Methode B auf der von Echols und Green (1971).

Der größte Unterschied dieser zwei Methoden bestand darin, daß bei Methode A DNase I aus Rinderpankreas zugesetzt wurde, um die zelleigene DNS zu verdauen. Bei der Methode B wurde dem Proteinextrakt keine DNase zugesetzt. Nach der letzten Dialyse beider Extrakte wurde der Proteingehalt nach der Methode von Lowry et al. (1951) gemessen. Im Zellextrakt der Probe A (d.h. gewonnen nach Methode A) betrug die Konzentration 900 µg ¹⁴C-markiertes Protein / ml und im Extrakt am 13 c₂⁻-infizierter Zellen der Probe B waren 1300 µg ¹⁴C-markiertes Protein / ml enthalten. 0,05 ml der Lösungen A bzw. B wurden im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Dabei entsprachen 504 cpm der Lösung A 1 µg Protein, bei der Lösung B waren 507 cpm 1 µg Protein gleichzusetzen.

4.2.2 Untersuchungen über die Bindungsfähigkeit der Zellextrakte A und B bei Anwendung unterschiedlicher Bindungsmethoden

Die Extrakte A und B wurden nach drei verschiedenen Methoden der Filterbindung unterworfen. Die erste Methode war die nach Echols und Green (1971), die zweite stammte von Rouvière-Yaniv und Gros (1975) und als dritte Anleitung wurde die Arbeit von Jessel et al. (1975) verwendet.

Die Methode von Echols und Green ließ die Proteine mit der DNS 5 min bei 0°C inkubieren (Methode I). Rouvière-Yaniv und Gros inkubierten das Reaktionsgemisch 10 min bei 37°C (Methode II) und bei Jessel et al. reagierten die Proteine und die DNS 10 min bei Raumtemperatur miteinander (Methode III). Die Zusammensetzung der Bindungspuffer dieser drei Methoden ist aus Tabelle 9 zu entnehmen.

Die Tabelle 10 zeigt den Unterschied in den Bindungsaktivitäten der Extrakte A und B. Gleichzeitig wurden auch die unterschiedlichen Filterbindungsmethoden I, II und III untersucht, sowie der Einfluß von ATP auf die Bildung des DNS-Protein-Komplexes.

Tabelle 9: Zusammensetzung der verschiedenen Bindungspuffer

Methode I	Methode II	Methode III
10 mmol/l Tris-HCl pH 7,4	20 mmol/l Tris-HCl pH 7,4	10 mmol/l Tris-HCl pH 7,4
0,25 mmol/l EDTA	0,1 mmol/l EDTA	0,1 mmol/l Dithio- threitol
20 mmol/l KCl	60 mmol/l KCl	3 % DMSO (Dimethyl- sulfoxid)
10 mmol/l $Mg(CH_3CO_2)_2$		1 mmol/l $Mg(CH_3CO_2)_2$
14 mmol/l 2-Mer- captoäthanol		10 µg/ml ESA

Tabelle 10: Abhängigkeit der Bildung des DNS-Protein-Komplexes von der Herstellung des Zellextraktes, der Methode der Bindung und der Anwesenheit von ATP im Reaktionsgemisch

Substrat	Methode I	Methode II	Methode III
Filter	19 cpm	16 cpm	18 cpm
Filter und Puffer	19 cpm	24 cpm	22 cpm
Extrakt A (900 µg Protein/ml)	7350 cpm	3607 cpm	5744 cpm
Extrakt A + H5-DNS (300 µg H5-DNS/ml)	5555 cpm	2921 cpm	5208 cpm
Extrakt A + H5-DNS + ATP (1,5 mmol/l)	6159 cpm	3571 cpm	6202 cpm
Extrakt B (1300 µg Protein/ml)	7010 cpm	6906 cpm	10123 cpm
Extrakt B + H5-DNS (300 µg H5-DNS)	11855 cpm Netto-Bindung 4845 cpm = 15,1%	6906 cpm	11355 cpm
Extrakt B + H5-DNS + ATP (1,5 mmol/l)	21018 cpm Netto-Bindung 14008 cpm = 43,6%	7183 cpm	10775 cpm

Vom Extrakt A betrug der Input 21426 cpm;

Vom Extrakt B betrug der Input 32107 cpm.

Wie aus der Tabelle 10 zu entnehmen ist, konnte der Extrakt F am besten einen Protein-DNS-Komplex bilden und zwar nach der Methode I. Fügte man diesem Reaktionsansatz nun noch ATP bis zu einer Endkonzentration von 1,5 mmol/l hinzu, wurde die Effektivität der Komplexbildung um 77,3 % erhöht, wenn die Bindungseffektivität ohne ATP gleich 100 % gesetzt wird, bzw. die Netto-Bindung nahm um 28,5 % zu. Bedauerlich ist, daß trotz Vorbehandlung der Filter nach der Methode h (Tabelle 8) die unspezifische Bindung der Proteine unverhältnismäßig hoch war.

Bei einer Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse zeigt sich, daß allem Anschein nach Protein-DNS-Komplexe gebildet werden (Tabelle 6). Eine Trennung der Komplexe von den übrigen Proteinen eines Extraktes Phagen-infizierten Zellen durch die Sedimentationszentrifugation ist jedoch nicht möglich gewesen (Kapitel 3).

Desweiteren hat sich gezeigt, daß die Herstellung dieser Extrakte ebenso Einfluß auf die Bindungsfähigkeit der Proteine hat wie die benutzte Bindungsmethode (Kapitel 4.2.1 und 4.2.2). Die Zugabe von ATP erhöht die Ausbeute an DNS-Protein-Komplexen.

4.2.3 Versuch der Identifizierung der Proteine, die an DNS binden

In den vorhergehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, daß zwischen Proteinen und DNS eine Komplexbildung stattfand. Es ist aber immer noch offen, welche Proteine an DNS binden.

Um dies zu untersuchen, wurde ein Extrakt am 13 c₂⁻-infiltrierter Zellen mit verschiedenen Mengen DNS unterschiedlicher Herkunft versetzt. Die Reaktionsansätze sahen wie folgt aus:

- | | |
|---|---|
| 1) 945 µl Bindungspuffer
50 µg Protein (= 55 µl)
1,5 mmol/l ATP | 2) 860 µl Bindungspuffer
50 µg Protein (= 55 µl)
25 µg H5-DNS (= 85 µl)
1,5 mmol/l ATP |
| 3) 110 µl Bindungspuffer
50 µg Protein (= 55 µl)
250 µg H5-DNS (= 850 µl)
1,5 mmol/l ATP | 4) 595 µl Bindungspuffer
50 µg Protein (= 55 µl)
250 µg Sal.-DNS (= 345 µl)
1,5 mmol/l ATP |

Dabei wurden pro 50 µg Protein bzw. 55 µl 35161 cpm ¹⁴C-counts gemessen. Die Reaktion erfolgte nach Methode I. Jeder Ansatz bestand aus fünf Proben. Jede Probe wurde über ein Filter abgesaugt und mit 0,5 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde aufgefangen, in Kollodiumhüllen konzentriert und anschließend auf ein 1 mm dickes SDS-Polyacrylamid-Gel gegeben. Die anderen Taschen des Polyacrylamid-Geles wurden mit denaturierten Proteinen

beladen, die vom DMS-Protein-Komplex, der sich auf dem Filter befand, gewonnen wurden.

Dazu wurden die Filter über Nacht in 2 mol/l NaCl geschüttelt und ebenfalls in Kollodiumhülsen konzentriert. Da in diesen Konzentraten nur sehr wenig Radioaktivität zu finden war, wurde zur Kontrolle ein Filter des Ansatzes Nr. 1 (siehe oben) in 5 ml Toluol-Szintillator gemessen. Von den Konzentraten der Waschflüssigkeiten und der mit NaCl vom Filter gewaschenen Radioaktivität wurden je 10 µl von jeder Probe in Triton-Toluol gemessen. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle 11.

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, befand sich der größte Teil der Radioaktivität noch gebunden auf dem Filter. Die Filter wurden daher in 150 µl Proben-Puffer nach Laemmli gekocht und die Radioaktivität, die sich nun in dem Puffer befand, in Triton-Toluol gemessen.

Tabelle 11: Messung der Radioaktivität von der konzentrierten Waschflüssigkeit, der eingeeengten 2 mol/l NaCl-Lösung und der Radioaktivität eines Filters

Konzentrierte Waschflüssigkeit		Konzentrierte, vom Filter mit 2 mol/l NaCl gewaschene Radioaktivität		Filter
Probe	cpm	Probe	cpm	Probe cpm
1 (5x)	110	W1 (5x)	39	1 3601
2 (5x)	179	W2 (5x)	44	(1 Filter)
3 (5x)	119	W3 (5x)	39	
4 (5x)	793	W4 (5x)	130	

Tabelle 12: Messung der Radioaktivität im Puffer, nachdem die Filter darin gekocht waren

Von dem Filter in Laemmli-Puffer gekochte Radioaktivität (5 µl)		Nach dem Kochen auf dem Filter verbliebene Radioaktivität	
Probe	cpm	Probe	cpm
		1	2732
F2	264	2	2969
F3	281	3	2665
F4	167	4	1550

In den Proben, in denen die Aktivität vom Filter gewaschen wurde, tritt das Genprodukt 9 in allen vier Bindungsansätzen auf. Das Genprodukt 5 erscheint dagegen hauptsächlich in dem Ansatz 4, der Salmonella-DNS enthält.

Bei den Proben, bei denen die Aktivität im Proben-Puffer nach Laemmli vom Filter gekocht wurde, tritt das Genprodukt 9 sehr schwach in den Ansätzen 2 und 3 auf. Das Genprodukt 5 läßt eine schwache Bande bei den Ansätzen 1, 2 und 3 erkennen. In den gleichen Ansätzen zeigt sich eine weitere deutliche Bande im Bereich der Proteine mit kleinen Molekulargewichten. Bei diesen Proben treten im Bereich der Proteine mit Molekulargewichten von 30.000 d bis 20.000 d (?) drei deutliche Proteinbanden auf (bei den Ansätzen ohne DNS und mit H5-DNS), die aber nicht identifiziert werden konnten.

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen ein unterschiedliches Verhalten der Proteine gegenüber der angebotenen DNS.

Das Genprodukt 9 scheint sehr stark an H5-DNS zu binden, sowie auch unspezifische Bindungen einzugehen, da es im Durchlauf (= konzentrierte Waschflüssigkeit) fehlt. Die Salmonella-DNS scheint unspezifische Bindung eher zu verhindern, da viel Aktivität in dem Ansatz mit Salmonella-DNS in der konzentrierten Waschflüssigkeit zu finden ist. Im Übrigen ist gebundene Aktivität nur sehr schwer wieder freizusetzen.

Das Genprodukt 5 bindet vorzugsweise an Salmonella-DNS (da hiervon die geringste Aktivität im Waschwasser ist) und ist leicht wieder von der DNS zu lösen, denn es kann praktisch alles wieder durch Waschen mit 2 mol/l NaCl-Lösung zurückgewonnen werden.

Das Genprodukt 8 tritt insgesamt in geringer Menge auf. Es scheint überall, außer bei dem Ansatz mit Salmonella-DNS, fest gebunden zu werden.

Die Banden in dem Bereich mit kleinen Molekulargewichten zeigen eine starke unspezifische Bindung, denn sie können erst durch das Kochen der Filter in Proben-Puffer entfernt werden. Diese unspezifische Bindung der Proteinbanden mit kleinem Molekulargewicht wird durch die Salmonella-DNS ebenfalls verhindert.

4.3 Methode der SDS-freien Polyacrylamid-Gele

Eine oft gebrauchte Methode zur Isolierung DNS-bindender Proteine ist die Verwendung von DNS-Zellulose-Säulen. Trotz mehrere Versuche konnten aber im Rahmen dieser Arbeit damit keine Ergebnisse erzielt werden. Offenbar bauten die in den Extrakten vorhandenen Nukleasen trotz entsprechender Vorbe-

handlungen (EDTA) die zellulosegebundene DNS ab.

Da es auch nicht möglich war, die Protein-DNS-Komplexe vom Filter zu lösen, wurde nach einer Methode gesucht, die es ermöglichte, die Proteine aufzutrennen, aber ihren nativen Zustand beizubehalten. Nach ihrer Auftrennung sollten mit den einzelnen Fraktionen Filterbindungstests durchgeführt werden.

Zur Proteinauftrennung denaturierter Proteine wurden SDS-Polyacrylamid-Gele gefahren. Es lag daher nahe, zur Auftrennung nativer Proteine ebenfalls die Methode der Gelelektrophorese anzuwenden, nur wurde das denaturierende Agens SDS sowohl im Gel als auch im Puffer vermieden. Die aufgetragenen Proteine wurden auch nicht durch Kochen in Probenpuffer denaturiert, sondern mit 10 %iger Sucrose versetzt und in die Taschen des Geles gefüllt. Die Zugabe von Sucrose war notwendig, um ein Absinken der Proben auf den Boden der Taschen zu erreichen.

4.3.1 Trennung der Proteinextrakte über SDS-freie Polyacrylamid-Gele

Es wurde ein 3 mm dickes SDS-freies Polyacrylamid-Gel benutzt. Die eine Hälfte des Geles wurde mit einem Extrakt am 13 c₂⁻-infizierter Zellen gefüllt, der nach Methode A (mit DNase I versetzt) gewonnen worden war, während auf die zweite Hälfte des Geles ein Extrakt am 13 c₂⁻-infizierter Zellen aufgetragen wurde, der nach Methode B (ohne DNase) hergestellt worden war. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das 9 cm lange Trenngel in 18 Fraktionen aufgeteilt, indem es in 0,5 cm breite Streifen geschnitten wurde. Die einzelnen Fraktionen (Streifen) kamen in Reagenzgläser und wurden mit 0,1 ml-Pipetten zerquetscht. Je Probe wurde 1 ml Bindungspuffer zugesetzt und das Ganze über Nacht im Kühlraum geschüttelt, um die Proteine aus dem Gelmaterial herauszulösen. Am nächsten Tag wurden ca. 0,2 bis 0,3 ml Flüssigkeit entnommen (Auszug 1). Zu den Proben wurden nochmals je 1 ml Bindungspuffer gegeben. Das Schütteln der Proben dauerte erneut 24 Stunden im Kühlraum. Nach der zweiten Entnahme wurden die Auszüge 1 und 2 der einzelnen Fraktionen vereinigt. Die Radioaktivität wurde gemessen und zur Identifizierung der Proteine ein Teil jeder Probe denaturiert und auf ein 1 mm dickes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Diese Menge an radioaktiv-markierten Proteinen war aber größtenteils zu gering, um in der Autoradiographie solche Proteine, von denen nur wenige Kopien synthetisiert wurden, zu erkennen (Abbildungen 20 und 21). Auf diesen Abbildungen sind aber die Hauptproteine erkennbar.

4.3.2 Zuordnung der zu erkennenden Banden zu Proteinen aufgrund der Wanderungsstrecke der Proteine

Die Banden, die auf den Gelen (Abbildung 20 = Extrakt A und Abbildung 21 = Extrakt B) zu erkennen sind, wurden durch Berechnung des Molekulargewichtes den einzelnen Proteinen zugeordnet (siehe Kapitel 2.1).

Die Proteine stammten aus den Fraktionen 1 bis 18 eines SDS-freien Polyacrylamid-Geles (siehe Abbildung 19), welche den Taschen 1 bis 18 des 1 mm dicken SDS-Polyacrylamid-Geles gleichzusetzen sind.

Beim Vergleich der Abbildungen 20 und 21 ist zu erkennen, daß die Art der Extrakterstellung Einfluß auf die Wanderungsstrecke der Proteine in SDS-freien Gelen hat. Das Genprodukt 9 ist in beiden Fällen in den Fraktionen 2 und 3 zu finden. Dies entspricht, in cm Laufstrecke übertragen, auch der Lage dieses Proteins unter denaturierenden Bedingungen. Andererseits taucht ein Genprodukt mit dem Molekulargewicht vom Genprodukt 19 im Extrakt A in der Fraktion 17, im Extrakt B hingegen bereits in der Fraktion 6 auf. Dieses unterschiedliche Verhalten einzelner Proteine bei der elektrophoretischen Auftrennung in SDS-freien Polyacrylamid-Gelen liegt sicherlich zum Teil an der Aufarbeitungsmethode des aufzutrennenden Extraktes Phagen-infizierter Zellen und zum anderen an der Abwesenheit von SDS vor und während der Elektrophorese.

Da die Proteine in den Zellen auch als Protein-Protein-Komplexe vorliegen können, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, sollte eine schonende Extrakterstellung diese Komplexe vollständig erhalten. Solche Proteinkomplexe wandern bei der elektrophoretischen Auftrennung in einem Detergenzien-freien System unter Umständen langsamer als die gleichen Proteine, die in ihre Untereinheiten zerfallen sind.

Die Auftrennung des Extraktes B läßt vermuten, daß dieser Extrakt unter sehr schonenden Bedingungen gewonnen wurde, denn Proteine mit kleinen Molekulargewichten erscheinen in dem Trennbereich der ersten Fraktionen, was eine kleine Wanderungsstrecke dieser Proteine in dem SDS-freien Polyacrylamid-Gel bedeutet. In dem Bereich der Fraktion 1 (Abbildung 21) sind z.B. zwei Proteine zu erkennen (Genprodukt ant, Genprodukt 8 ?), die ein Molekulargewicht um 30.000 d besitzen, aber in dem SDS-freien Gel nicht weiter als 0,5 cm gewandert sind (Fraktion 1 des SDS-freien Geles, siehe Abbildung 19). Vermutlich lagen diese beiden Proteine in dem Extrakt als Komplexe vor und sind erst unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-haltigen Gelelektrophorese in diese beiden Untereinheiten zerfallen. Dabei könnten sie sowohl Aggregate miteinander als auch mit anderen Proteinen oder auch einen DNS-Protein-Komplex gebildet haben. Bedeutsam ist sicher auch, daß bei Methode P keine DNase anwesend ist, welche im Extrakt bestehende

DNS-Protein-Komplexe durch DNS-Abbau auflösen würde. So wäre ein DNS-Protein-Komplex oder ein Protein-Protein-Komplex zwischen Genprodukt ant und Genprodukt 8 bzw. zwischen diesen beiden markierten Phagenproteinen und unmarkierten Bakterienproteinen am ehesten denkbar, da nur diese beiden Phagenproteine in der Fraktion 1 des Gels mit nicht denaturierenden Bedingungen zu finden sind.

Die in Abbildung 21 wiedergegebene Auftrennung des Extraktes B läßt nun die Deutung zu, daß die Herstellungsmethode B wesentlich schonender ist als die Methode A. Diese Aussage wird auch von den in Kapitel 4.2.2 berichteten Ergebnissen gestützt, wonach von Proteinen aus dem Extrakt B mehr DNS-Protein-Komplexe gebildet werden als von Proteinen aus dem Extrakt A.

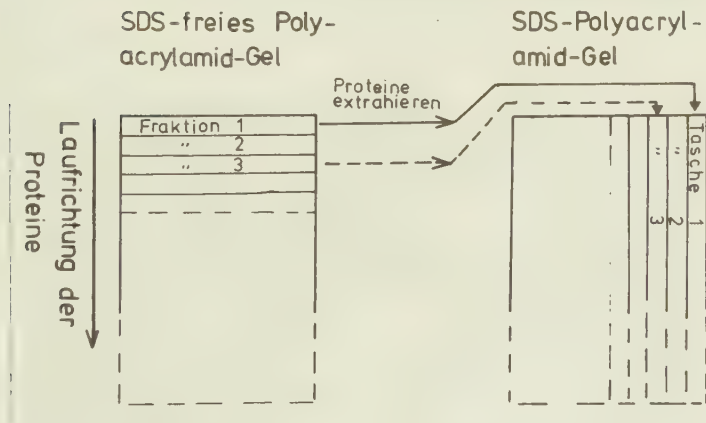


Abbildung 19: Skizze zur Verdeutlichung der Identifizierung der Proteine aus einem bestimmten Abschnitt des SDS-freien Gels in einem SDS-Polyacrylamid-Gel.

Mit den einzelnen Fraktionen der zurückgewonnenen Proteine wurde eine Filterbindung durchgeführt. Dieser Versuch brachte jedoch keinen Aufschluß darüber, welche Proteine an DMS binden und welche keine Bindung eingehen. Für diese Untersuchungen war die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen zu gering.

4.4 Trennung von Proteinextrakten über Sucrosegradienten und Identifizierung der aufgetrennten Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gele und Autoradiographie

Bei der Rückgewinnung der Proteine aus SDS-freien Polyacrylamid-Gelelen war die Ausbeute sehr gering. Es wurde deshalb versucht, den Proteinextrakt über Sucrosegradientenzentrifugation aufzutrennen, um eventuell einzelne Proteine zu isolieren. Die früheren Sedimentationszentrifugationen wurden vor allem mit DMS-Protein-Mischungen durchgeführt, in der Hoffnung, daß gebildete DMS-Protein-Komplexe eventuell isoliert werden könnten. Bei diesen Zentrifugationen sollte vor allem untersucht werden, ob einzelne Proteine eines Extraktes am-infizierter Zellen durch Zentrifugation gewonnen werden konnten.

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein neutraler linearer 10-50 %iger Sucrosegradient (17 ml) mit 0,5 ml aufgetragener Probe gefahren. Dieser Gradient wurde in 20 Tropfen-Fraktionen in Eppendorf-Reaktionsgefäße ausgetropft. 20 µl wurden von jeder Probe verwendet, um die radioaktiven Impulse pro min zu messen, die in den Proben enthalten waren. Das Sedimentationsprofil dieses Gradienten ist in Abbildung 22 wiedergegeben. Von den Peakfraktionen 1 bis 6 und 30 bis 46 wurden je zwei Fraktionen zusammengefaßt, auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Laufbedingungen dieses Geles waren 30 mA, 3 Stunden Laufzeit. Dieses Gel ist auf Abbildung 23 wiedergegeben.

Die Auswertung dieses Geles zeigt, daß die Proteine zwar getrennt werden konnten, jedoch nicht in der Weise, daß man einer bestimmten Fraktion ein bestimmtes Protein zuordnen konnte.

Man kann eine gewisse Einteilung der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes erkennen, jedoch erscheinen gewisse Proteine, wie z.B. das Genprodukt 5, praktisch in jeder Fraktion, vorwiegend aber in den Fraktionen des schnell sedimentierenden Peaks.

Die Tatsache, daß z.B. die Genprodukte 1 und 5 sowohl in den Fraktionen 3 bis 6 des Sucrosegradienten (Abbildungen 22 und 23), als auch in den Fraktionen 30 bis 37 und 42 bis 46 vorkommen, kann eventuell damit erklärt werden, daß in den Extrakten aus infizierten Zellen schon Proheads vorgelegen haben, die im Sucrosegradienten schneller gewandert sind

(Fraktionen 3 bis 6) als die reinen Proteinmoleküle (Fraktionen 42 bis 46). Die in den Fraktionen 30 bis 37 auftretenden Proteine könnten durch Zwischenstufen bzw. Aggregationen von Proteinen auf dem Weg zu Proheads verursacht worden sein.

Bei dem Genprodukt 5 könnte das erneute Auftreten in den letzten fünf Fraktionen auch von dem Protein mit gleichem Molekulargewicht verursacht worden sein, welches in Proteinauftrennungen normalerweise vom Genprodukt 5 überlagert wird.

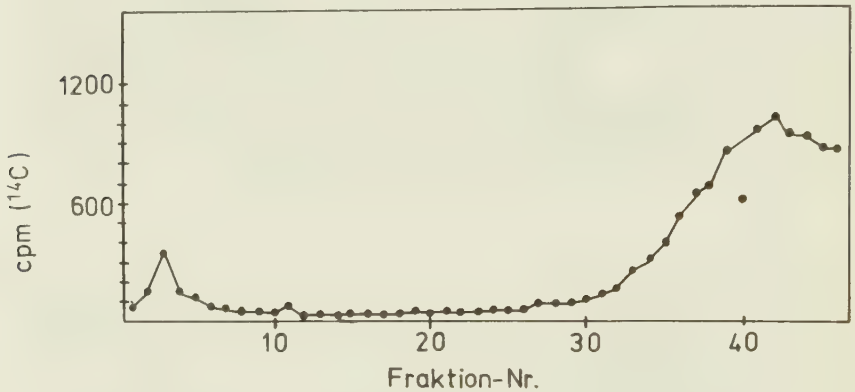


Abbildung 22: Auftrennung eines Extraktes am 13 c_2^- -infizierter Zellen in einem 10-50 %igen linearen neutralen Sucrosegradienten, der 1 ml 66 % (w/w) Sucrose als Kissen enthielt. Das Gesamtvolumen betrug 17 ml. 0,5 ml Probe wurden aufgetragen. Laufbedingungen: Rotor SW 27.1 der Beckman-Ultrazentrifuge L2, 25.000 rpm, 65 h, 5°C. Von den Peakfraktionen 1 bis 6 und 30 bis 46 wurden je zwei Fraktionen zusammengefaßt und über ein SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Der Versuch, das Proteingemisch der Peakfraktionen durch erneute Zentrifugation besser aufzutrennen, schlug fehl. Die Proteine des Extraktes konnten so nicht sauber nach den Molekulargewichten aufgetrennt werden.

4.5 Identifizierung der Proteinmischung über eine Sephadex G-100 Säule

Da es weder mit SDS-freien Gelen noch mit der Methode der Sedimentationszentrifugation möglich war, Extrakte am 13 c_2^- -infizierter Zellen aufgrund der Molekulargewichte der Proteine präparativ aufzutrennen, wurde eine Sephadex G-100 Säule vorbereitet. Die Sephadex G-100 Säule arbeitet wie ein Molekularsieb und trennt Proteine in dem Molekulargewichtsbereich von 4.000 d bis 150.000 d. Dabei wandern die Proteine mit hohen Molekulargewichten schneller als die Proteine, die kleinere Molekulargewichte haben.

4.5.1 Filterbindungstests der einzelnen Fraktionen der Sephadex G-100 Säule

Ein radioaktiv-markierter Extrakt am 13 c_2^- -infizierter Zellen wurde gegen Bindungspuffer dialysiert. Nach Beendigung der Dialyse waren in 10 μl des Extraktes noch 8.372 cpm zu messen. Zu 1,5 ml dieses Extraktes wurde KCl bis zu einer Konzentration von 0,5 mol/l zugefügt, um eine Aggregation der Proteine in dem Extrakt zu vermeiden (Hafeti und Hanstein, 1974). Diese 1,5 ml wurden über eine Sephadex G-100 Säule gegeben und in 46 Fraktionen zu je 2 ml eluiert. Zur optischen Kontrolle wurden dem Proteinextrakt zwei Farbmarker (Dextranblau = 2.000.000 d und Phenolrot = 345 d) zugesetzt.

Die 46 Fraktionen wurden gegen Bindungspuffer dialysiert (dreimaliger Wechsel der Dialyseflüssigkeit), um die Extrakte von dem zugefügten KCl zu befreien.

Von den einzelnen Proben wurden 50 μl entnommen und die Radioaktivität in 5 ml Triton-Toluol gemessen. Die Verteilung ist aus Abbildung 24 zu entnehmen.

Von den erhaltenen 46 Fraktionen wurden Filterbindungstests durchgeführt. Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

- 1) 400 μl Proteinlösung (700 μg Protein / ml in Bindungspuffer)
 - 40 μl Puffer ohne DNS
 - 40 μl ATP (15 mmol/l)
- 2) 400 μl Proteinlösung (siehe Ansatz Nr. 1)
 - 40 μl H5-DNS (700 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
 - 40 μl ATP (15 mmol/l)
- 3) 400 μl Proteinlösung (siehe Ansatz Nr.1)
 - 40 μl Salmonella-DNS (700 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
 - 40 μl ATP (15 mmol/l)

Die Ansätze durften 5 min in Eis reagieren und wurden über

Nitrozellulosefilter abfiltriert. Nach dem Waschen der Filter mit 0,5 ml Bindungspuffer wurden diese getrocknet und die Radioaktivität in Toluol-Szintillator gezählt.

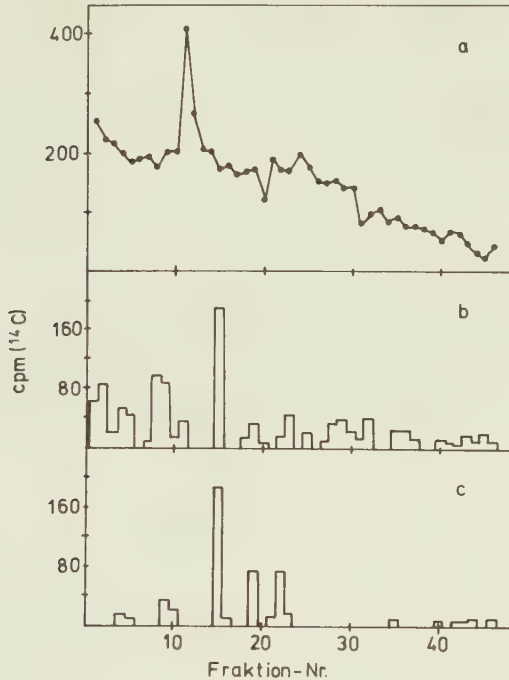


Abbildung 24: Verteilung der ^{14}C -Radioaktivität in den 46 Fraktionen des Eluates der Sephadex G-100 Säule und die Ergebnisse des Bindungstests an Salmonella- bzw. Phagen-DNS.

- (a) Verteilung der eluierten Proteine in den einzelnen Fraktionen - gemessen wurde die ^{14}C -Radioaktivität.
- (b) An Salmonella-DNS gebundene ^{14}C -Radioaktivität der Proteine in den einzelnen Fraktionen nach Abzug der Kontrolle für unspezifische Bindung.
- (c) An Phagen-DNS gebundene ^{14}C -Radioaktivität der Proteine in den entsprechenden Fraktionen nach Abzug der Kontrolle für unspezifische Bindung.

In Abbildung 24 b und c ist die an Salmonella- bzw. Phagen-DNS gebundene Aktivität nach Abzug der Kontrolle für unspezifische Bindung aufgetragen. Dabei sind deutliche Unterschiede zu erkennen.

- (1) An Salmonella-DNS bindende Proteine finden sich praktisch über das gesamte Profil verteilt, auch in den Fraktionen, welche gar nicht an Phagen-DNS binden (z.B. die Fraktionen 27 bis 32).
- (2) In den meisten Fraktionen, deren Proteine an beide DNS-Arten binden, sind die an Salmonella-DNS gebundenen Proteinmengen größer als die an Phagen-DNS gebundenen. Ausnahmen stellen nur die Fraktionen 19 und 22 dar, in denen offenbar Proteine enthalten sind, welche eine etwas höhere Affinität zu Phagen-DNS haben, sowie die Fraktionen 16 und 21, die wohl an Phagen-DNS binden, nicht aber an Salmonella-DNS.
- (3) Das Protein oder die Proteine der Fraktion 15 zeigen die höchste gebundene Aktivität (obwohl sie nicht die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration ist). Es besteht aber kein Unterschied in der Bindung an die beiden DNS-Arten.

4.5.2 Identifizierung der Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gele und nachfolgende Autoradiographie

Der nach der Filterbindung verbliebene Teil der Eluate (ca. 800 μ l) wurde mit festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt bis eine gesättigte Lösung vorlag und die Proteine ausgefällt wurden. Die ausgesalzten Proteine wurden bei 25.000 g pelletiert, in Probenpuffer aufgenommen, denaturiert und zur Identifizierung auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und autoradiographiert (Abbildung 25).

Die Proteine der Fraktionen 25 bis 46 waren auf dem Gel nicht auffindbar, da wahrscheinlich zu wenig Protein aufgetragen werden konnte. Leider hat das Gel mit den konzentrierten Fluat 1 bis 24 nicht fehlerfrei polymerisiert. Es ist aber dennoch zu erkennen, daß in den ersten Fraktionen, entsprechend den ersten Eluaten, in denen die Proteine mit hohen Molekulargewichten enthalten sind, diese vermuteten Proteine auch nachweisbar sind. Es können die Proteine 1, 9, 16, 5 und 8 identifiziert werden, auch wenn sie nicht klar getrennt sind. Sehr gut ist allerdings zu erkennen, daß in diesem Fall in den Taschen 11 und 12 das Genprodukt 5 erscheint, und zwar in größerer Menge als alle anderen Proteine. Wie aus Abbildung 24 b und c ersichtlich ist, bindet nur die Fraktion 11 geringfügig an Salmonella-DNS und keine der beiden Fraktionen an H5(-Phagen)-DNS.

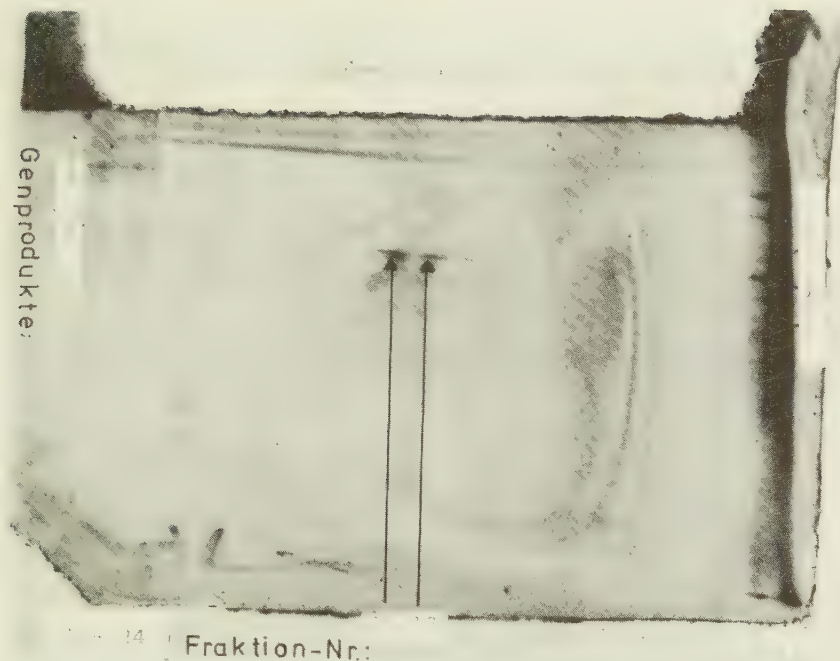


Abbildung 25: Autoradiographie der Fraktionen 1 bis 24, die mittels der Sephadex G-100 Säule erhalten wurden.

Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung, die in Kapitel 4.2.3 gemacht wurde. Auch dort konnten die Versuche, die unternommen worden waren, um DNS-Protein-Komplexe von Nitrozellulosefiltern zu lösen, in der Weise interpretiert werden, daß das Genprodukt 5 zu diesem Zeitpunkt (30 bis 40 min nach Phageninfektion) nicht an H5-DNS bindet, wohl aber an Salmonella-DNS.

4.6 Trennung der Proteinlösung über den Anionenaustauscher DPAF-Zellulose

Parallel zur Auftrennung der Proteinextrakte über Sephadex G-100 wurde auch eine Anionenaustauschersäule verwendet. Es sollte versucht werden, die Proteine aufgrund ihrer Bindungsstärke zu dem Anionenaustauscher zu trennen. Die Eluate (=Fraktionen) wurden anschließend einem Filterbindungstest unterworfen und die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gele identifiziert.

4.6.1 Filterbindungstest der einzelnen Fraktionen der Elution vom Anionenaustauscher DEAF-Zellulose

1,5 ml eines Extraktes am 13 c_2^- -infizierter Zellen wurden über den Anionenaustauscher DF 22 von Whatman Ltd. gegeben. Die Proteine wurden mit einem linearen KCl-Gradienten von 0,0 mol/l bis 1,0 mol/l eluiert. Es wurde 98 Fraktionen zu je 2 ml erhalten. Von diesen Fraktionen wurden je 50 μl in Triton-Toluol gemessen. Abbildung 26 gibt das Auftreten der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen wieder. Fraktionen mit weniger als 27 Impulsen pro min wurden nicht weiter verwendet.

Aus dieser Abbildung ist zu ersehen, daß die Auftrennung eines Extraktes Phagen-infizierter Zellen mit dieser Methode noch die besten Ergebnisse gebracht hat, denn die Trennung ist wesentlich besser als bei der Sephadex-Säule oder der Sedimentationszentrifugation.

Von den verbliebenen Fraktionen wurden Filterbindungstests durchgeführt, nachdem die Proben nach dreimaliger Dialyse gegen den Bindungspuffer wieder salzfrei waren. Die Zusammensetzung der Bindungsansätze war die gleiche wie bei der Filterbindung mit den Proben nach der Auftrennung über die Sephadex G-100 Säule (siehe Kapitel 4.5.1.)

Die Ansätze durften 5 min im Eis reagieren, wurden filtriert, gewaschen, getrocknet und die Radioaktivität auf den Filtern gezählt.

Die Ergebnisse der Filterbindung sind in Abbildung 26 b und c, wiederum getrennt für Salmonella-DNS und Phagen-DNS, nach Abzug der unspezifisch gebundenen Radioaktivität dargestellt. Auch hier bestätigt sich die aus Abbildung 25 b und c entnommene Beobachtung, daß Bindungsfähigkeit an Salmonella-DNS fast über den ganzen Elutionsbereich zu finden ist und daß in Fraktionen, deren Proteine an beide DNS-Arten binden, im allgemeinen die bessere Bindung an bakterielle DNS erfolgt.

Besonders auffällig ist dies für den Bereich um Fraktion 20, aber auch zwischen 40 und 55 sowie ab Fraktion 73, wobei Fraktion 89 besonders herausragt. Im Bereich zwischen den Fraktionen 25 und 40 erfolgt fast ausschließlich Bindung an Salmonella-DNS und dies zu einem beachtlichen Anteil.

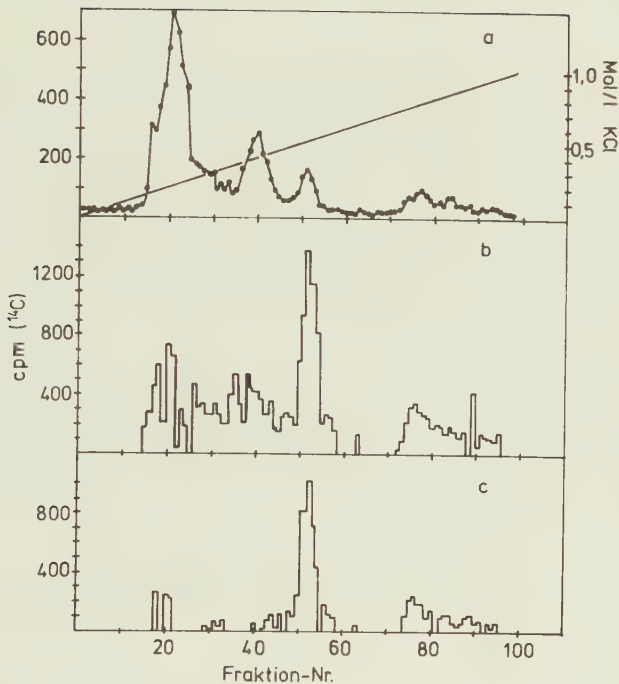


Abbildung 26: Auftreten der ^{14}C -Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen des Eluates von dem Anionenaustauscher DEAE-Zellulose. Fingetragen ist außerdem der lineare KCl-Gradient von 0,0 mol/l bis 1,0 mol/l mit dem die Proteine eluiert wurden.

- (a) Verteilung der ^{14}C -Radioaktivität der eluierten Proteine in den einzelnen Fraktionen des KCl-Gradienten
- (b) Verteilung der gebundenen ^{14}C -Radioaktivität an DNS von Salmonella, nach Abzug der Kontrolle für unspezifische Bindung
- (c) Verteilung der gebundenen ^{14}C -Radioaktivität an DNS von Phagen, nach Abzug der Kontrolle für unspezifische Bindung

4.6.2 Identifizierung der Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gele und nachfolgende Autoradiographie

Es war nun wünschenswert, festzustellen, welche Proteine in den entsprechenden Fraktionen diese Bindung durchführten. Daher wurde der Rest der Fraktionen (wie unter 4.5.2 beschrieben) konzentriert und auf 10 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Diese Gele sind in Abbildung 27 wiedergegeben. Auf dieser Abbildung ist zu sehen, daß das Genprodukt 5 in allen Fraktionen vorhanden ist, bei niedriger Salzkonzentration allerdings mehr als bei höherer Konzentration (Fraktionen 15 bis 35). In der Fraktion 35 ist immer noch eine größere Menge Genprodukt 5 nachweisbar. Dieser Fraktion entspricht eine Salzkonzentration von 0,37 mol/l KCl.

Das Genprodukt 9 ist in den Fraktionen 16 bis 19 sehr stark vertreten. In der letzten Geltasche (Fraktion 81) tritt ebenfalls ein Protein des Molekulargewichtes vom Genprodukt 9 auf. Da für das Genprodukt 9 jedoch im Gegensatz zum Genprodukt 5 kein "Doppelgänger" bekannt ist, sollte es sich hier wirklich um eine Form vom Genprodukt 9 handeln, die möglicherweise aus strukturellen Gründen erst so spät auftritt. Diese Fraktionen zeigen bei dem Bindungstest (Abbildung 26 b und c) nicht nur Bindungsfähigkeit an *Salmonella*-DNS, sondern auch an H5(-Phagen)-DNS.

Das Genprodukt 1 kann in den Fraktionen 38 bis 41 identifiziert werden. Es tritt dort stärker in Erscheinung als das Genprodukt 5. Das Genprodukt 1 wurde also bei einer Salzkonzentration von 0,38 bis 0,41 mol/l KCl aus der Anionenaustauschersäule eluiert.

In den Fraktionen, in denen das Genprodukt 5 stark vertreten ist, ist auch das Genprodukt 8 nachweisbar. Der Grund hierfür kann darin liegen, daß diese beiden Proteine zusammen den Prohead aufbauen und möglicherweise bereits als solche Aggregate an die Zellulose gebunden und wieder eluiert werden.

Trotz der guten Auftrennung der Proteine über DEAF-Zellulose sowie der deutlich unterschiedlichen Bindungsfähigkeit der Proteine in den einzelnen Fraktionen war es leider auch hier nicht möglich, diese Bindungsfähigkeit definierten Proteinen zuzuordnen. Ein Grund dafür ist, daß maximale Bindung gerade mit Fraktionen geringster Proteinmengen (= niedrigster Radioaktivität) erfolgte (Fraktionen 30 bis 34, 47 bis 54), die eine Identifikation der beteiligten Proteine unter den gegebenen Verhältnissen nicht erlaubten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß es sich dabei vorwiegend um Proteine mit katalytischen Funktionen handelt, die nur in geringer Menge benötigt werden, im Gegensatz zu Strukturproteinen, die meist irreversibel durch die Phagenreifung aus dem Pool entfernt werden und daher in großer Menge zur Verfügung stehen müssen.

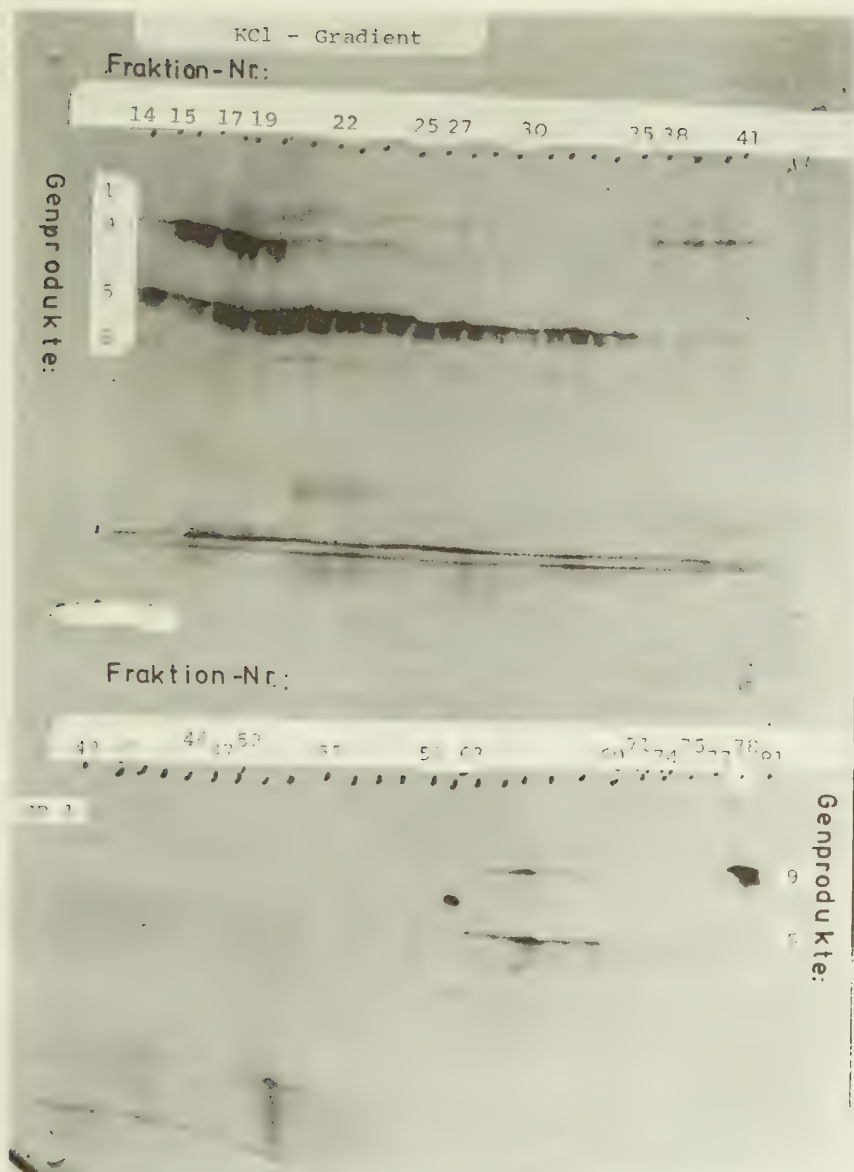


Abbildung 27: Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine aus den Eluatzen des Anionenaustauschers DEAE-Zellulose

D) DISKUSSION

=====

Zielsetzung dieser Arbeit war es, einerseits Phagen-induzierte Proteine zu identifizieren und andererseits solche Phagen-eigene Proteine zu bestimmen, die an Salmonella-DNS bzw. Phagen-DNS binden können.

Im Rahmen des ersten Teiles dieser Arbeit wurde besonders auf die Genprodukte 2, 16, 13 und 19 geachtet, da über diese nur geringe Informationen vorlagen.

Das Gen 2 codiert, ebenfalls wie die Gene 1 und 3, für ein Protein, welches für die Füllung der Phagenköpfe mit DNS verantwortlich ist. Am 2-infizierte Zellen bilden zwar normale Proheads und synthetisieren DNS, reife Phagen können jedoch nicht entstehen.

Das Gen 16 codiert für ein Protein, welches für die Infektiosität der Phagen verantwortlich ist. Zellen, die mit am 16-Mutanten infiziert wurden, liefern normal aussehende Phagenpartikel, die aber nicht infektiös sind.

Die Gene 13 und 19 sind für Proteine verantwortlich, die zur Lyse der Zellen und der Freisetzung der Phagenpartikel benötigt werden (Levine, 1972).

Außer diesen Genen, bzw. Genprodukten, wurden die radioaktiv-markierten Proteine der HT-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp H5 untersucht, sowie zu Rekombinanten der Transduktionsmutante HT 12/4, die in bezug auf die Transduktion wieder Wildtypeigenschaften aufweisen. Die bisher untersuchten HT-Mutanten kartieren alle im Bereich des Genes 3, welches aus diesem Grunde auch in die Untersuchungen miteinbezogen wurde.

Ein anderer Grund für das Interesse am Gen 3 und seinem Produkt ergibt sich aus neueren Untersuchungen, sowohl mit genetischen Methoden von Weaver und Levine (1978) als auch mit dem Restriktionsenzym Eco RI von Jackson et al. (1978), die gezeigt haben, daß die Stelle, wo die DNS-Verpackung beginnt, in der Nähe des Genes 3 liegt.

Die Genprodukte 13 und 19, die für die Lyse der Zellen und die Freisetzung der Phagenpartikel verantwortlich sind (Levine, 1972; Susskind und Botstein, 1978), konnten bisher in Proteinauftrennungen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese noch nicht nachgewiesen werden. Susskind und Botstein (1978) geben lediglich das Molekulargewicht vom Genprodukt 19 mit 20.000 d an, welches aufgrund seiner enzymatischen Aktivität bestimmt wurde.

Im Verlauf dieser Arbeit durchgeführte Proteinauftren-

nungen von Zellextrakten, die mit der Mutante am 19 infiziert waren, wurden im Bereich des Molekulargewichtes von 20.000 d auf eventuelle Veränderungen der Bandenmuster überprüft. In der in Abbildung 10 wiedergegebenen Auftrennung tritt bei dem mit am 19 infizierten Zellextrakt in dem Bereich der Molekulargewichte von 20.000 d im Vergleich zu den Proteinauftrennungen von am 3- und am 5-infizierten Zellen in diesem Bereich eine Proteinbande auf, die sehr viel schwächer ausfällt. Dies könnte als Bestätigung des vermuteten Molekulargewichtes des Genproduktes 19 angesehen werden. Die schwache Bande in diesem Bereich könnte von intakten Proteinmolekülen des Genproduktes 19 verursacht werden, die trotz der Schädigung dieses Genes gebildet werden.

Diese als "leakiness" bezeichnete Eigenart der amber-Mutanten läßt sich gut mit der "Wobble"-Hypothese (Crick, 1966; Söll et al., 1967) erklären. Durch die Degeneration des genetischen Codes können für eine Aminosäure mehrere t-RNS-Moleküle zur Verfügung stehen. Dabei paaren sich die ersten zwei Basen korrekt in der Codon-AntiCodon-Verbindung, während die dritte Base verschiedene Paarungen eingehen kann ("wobble").

Das Gen 13 codiert ebenso wie das Gen 19 für ein Protein, welches für das Lysieren der Wirtszellen benötigt wird, aber auf die Phagenreifung selbst keinen Einfluß nimmt. Das Genprodukt 13 konnte identifiziert werden (Abbildungen 7 und 11) und es wurde aufgrund seiner Wanderungsgeschwindigkeit in SDS-Polyacrylamid-Gelen ein Molekulargewicht von 28.000 d errechnet.

Auf der Abbildung 11 ist bei der Mutante NI 6/2a am 13 o_2^- noch ein Genprodukt 13 zu erkennen (Bande), jedoch ist diese Bande wesentlich schwächer vorhanden als bei den Proteinauftrennungen der Mutanten H5 und HT 12/4. Dies dürfte ein Zeichen dafür sein, daß dieser Phage zwar in dem Gen 13 geschädigt ist, aber das Genprodukt deswegen nicht zu 100 % ausfallen muß. Es scheint hier ebenso eine "leakiness" vorzuliegen, wie in der am 19-Mutante.

Ein Schritt in der Phagenreifung ist das Verpacken und Schneiden der DNS von DNS-Konkatemeren zu "headful"-DNS-Stücken. Ein Prohead (Vorläuferstruktur des reifen Phagenkopfes), der das Genprodukt 1 enthält, kann bei Anwesenheit der Genprodukte 2 und 3 DNS von Konkatemeren verpacken und, nachdem der Phagenkopf mit DNS gefüllt ist (headful), diese DNS von dem Konkatemer schneiden. Bei Abwesenheit eines der drei Genprodukte 1, 2 oder 3 können keine stabilen Phagenköpfe gebildet werden.

Hingegen werden vollkommen normal aussehende Phagenpartikel gebildet, wenn das Genprodukt 16 fehlt. Allerdings sind diese Phagenpartikel nicht infektiös. Sie können zwar an eine Wirtszelle adsorbieren, sind aber nicht in der Lage,

die DNS zu injizieren (Susskind und Botstein, 1978).

Den Genprodukten 2 und 16 werden in der Literatur die Molekulargewichte 63.000 d (für das Genprodukt 2) und 67.000 d (für das Genprodukt 16) zugeordnet. Die Abbildungen 8 und 9 lassen jedoch erkennen, daß das Genprodukt 16 nicht unmittelbar auf das Genprodukt 9 (76.000 d) folgt. Die dem Genprodukt 9 folgende Bande mit einem kleineren Molekulargewicht von 76.000 d konnte noch keinem Gen zugeordnet werden. Nach dieser Bande ist dann das Genprodukt 2 mit einem Molekulargewicht von 67.000 d zu erkennen. Erst dann taucht das Genprodukt 16 mit einem Molekulargewicht von 63.000 d auf. Besonders auf der Abbildung 8 ist recht gut zu erkennen, daß das Genprodukt 16 keinesfalls ein Molekulargewicht von 67.000 d haben kann, wie es in der Literatur (Susskind und Botstein, 1978) bisher immer beschrieben wurde. Es ist vielmehr eindeutig, daß das Protein mit einem Molekulargewicht von 67.000 d das Genprodukt 2 sein muß.

Um zu überprüfen, ob das Molekulargewicht des Genproduktes 16 tatsächlich kleiner ist als das Molekulargewicht des Genproduktes 2, wurde von zwei am 16-Mutanten, die an verschiedenen Orten im Gen 16 defekt sind (Nr. 34 und Nr. 39), zu den Zeiten 15 min, 30 min und 45 min nach Infektion der Zellen mit diesen Mutanten Proben entnommen und die Zellextrakte über SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetrennt. Dabei zeigte sich gleichzeitig, daß unter den gewählten Bedingungen 15 min nach Phageninfektion weder bei der Mutante Nr. 34 noch bei der Mutante Nr. 39 die "späten" Genprodukte 1, 9 und 2 nachweisbar sind. Bei der Mutante Nr. 39 erscheint zusätzlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von 90.000 d.

30 min nach Phageninfektion sind in geringer Menge die Genprodukte 1 und 9 bei beiden Mutanten zu erkennen. Während bei der Mutante Nr. 34 das Genprodukt 2 sichtbar ist, ist dieses bei der Mutante Nr. 39 noch nicht zu beobachten. Das neu aufgetretene Protein mit dem Molekulargewicht von 90.000 d liegt in etwa gleicher Menge vor, wie das Genprodukt 1. Bei der Mutante Nr. 34 sind nach 45 min alle Genprodukte, soweit sie gebildet und verfolgt wurden, in normaler Menge vorhanden.

Die Bande mit dem Protein von 90.000 d der Mutante Nr. 39 ist nach 45 min restlos verschwunden. Anstelle dieses Proteins ist jetzt aber das Genprodukt 2 aufgetreten, von dem bei der 30 min-Entnahme noch nichts zu sehen war. Dieses Protein (Genprodukt 2) liegt nach 45 min in gleicher Menge vor, wie bei der Mutante Nr. 34, obwohl sich die Zunahme dieses Genproduktes mit Hilfe der zeitlich unterschiedlichen Entnahmen der Proben nicht verfolgen ließ.

Nun stellt sich die Frage nach der Funktion dieses Proteins. Hier können nur Vermutungen angestellt werden. Es ließe sich jedoch denken, daß diese Mutante für ein Protein eine Vorläuferstruktur bildet, die im Verlauf der Phagen-

reifung dann in die endgültige Form übergeht, nachdem diese Vorläuferstruktur von einer Protease zu dem Protein geschnitten wurde.

Dieses akkumulierte Protein verschwindet bei der am 16-Mutante Nr. 39 aber in dem Zeitraum der Probenentnahme 30 min bis 45 min nach Infektion und dafür taucht das Genprodukt 2 auf. Es kann daher vermutet werden, daß von dieser Mutante eine Protease über einen "bypass" synthetisiert wird, wie dies z.B. bei der DNS-Verpackung des Phagen λ der Fall ist (D-bypass), der von Hohn et al. (1974) beschrieben wurde.

Veränderungen im Bandenmuster treten auch bei den Transduktionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp (H5) auf. Auf der Abbildung 11 ist zu erkennen, daß die Bande "y" der Mutante HT 12/4 schneller läuft als bei den vergleichbaren Banden der anderen Mutanten. Das heißt, dieses Protein ist kleiner als bei den anderen Mutanten, es konnte jedoch nicht geklärt werden, um welches Protein es sich handelt. Bei späteren Proteinauftrennungen und längeren Laufzeiten war dieses Protein nicht mehr auffindbar.

Die Abbildungen 11 und 12 lassen erkennen, daß die Mutante NT 12/1 am 13 c_2^- weniger Genprodukt 1 bildet als die anderen Mutanten. Diese Mutante NT 12/1 am 13 c_2^- gehört zu den Transduktionsmutanten die mit einer sehr viel geringeren Häufigkeit bakterielle DNS verpacken als der "Wildtyp" H5. Mit Hilfe genetischer Untersuchungsmethoden konnte gezeigt werden, daß diese Mutante im Bereich des Genes 1 kartiert.

Das Genprodukt 1 (94.000 d) ist am Aufbau des Proheads (Vorläuferstruktur des Phagenkopfes) mitbeteiligt. Mutanten, die im Gen 1 defekt sind, produzieren zwar erkennbare Proheads, sind aber nicht in der Lage, den nächsten Schritt in der Morphogenese, die DNS-Verpackung, auszuführen.

Die Tatsache, daß das Genprodukt 1 vom Phagen NT 12/1 in wesentlich geringerer Menge produziert wird, ist auch eine plausible Erklärung dafür, daß NT 12/1 auffallend kleine Plaques als Folge geringer Wurfgröße bildet. Das Genprodukt 1 ist offenbar limitierender Faktor für die Zahl von Proheads, die zur Füllung mit DNS in Frage kommen. Außerdem scheint diesem Protein aber auch noch eine Funktion bei der Auswahl der zu verpackenden DNS zuzukommen. Wie wäre es sonst zu erklären, daß bei dieser Mutante bakterielle DNS zu einem auffallend geringeren Anteil verpackt wird als beim Wildtyp, was zum Phänotyp der schwach transduzierenden NT-Mutanten führt?

Bei dem Phagen NT 6/2a am 13 c_2^- , dessen Mutationsort im Bereich der Gene 5 und 8 bestimmt wurde und der ebenfalls zu den Mutanten mit geringer Transduktionshäufigkeit gehört, konnten keine Veränderungen im Bandenmuster erkannt werden.

Die Mutante NT 1/1 am 13 c₂⁻, ebenfalls eine Mutante mit geringer Transduktionshäufigkeit, weist eine Mutation im Bereich der Gene 3 und 19 auf. Da das Gen 19 für ein Protein mit Lysisfunktion codiert, ist nicht anzunehmen, daß die veränderte Transduktionseigenschaft auf eine Mutation des Genes 19 zurückzuführen ist. Eher bietet sich dafür eine Mutation im Gen 3 an, dessen Genprodukt erst als Nuklease postuliert wurde, neuerdings aber mehr als Erkennungskomponente erklärt wird und welches zusammen mit dem Genprodukt 2 für die DNS-Verpackung und das Schneiden der DNS-Konkatemere zu "headfuls" verantwortlich zu sein scheint.

Zieht man zur Auswertung auch die Abbildung 5 hinzu, so ist zu erkennen, daß das Genprodukt 3 (9.500 d) bei den Mutanten HT 12/4, NT 1/1 am 13 c₂⁻ und NT 12/1 am 13 c₂⁻ nicht sichtbar ist. Dieses scheinbare Fehlen des Genproduktes 3 wäre bei den Transduktionsmutanten HT 12/4 und NT 1/1 am 13 c₂⁻ plausibel. Die HT-Mutanten HT 12/4 und HT 13/4 wurden kartiert (Raj, Raj und Schmieger, 1974) und der Mutationsort im Gen 3 festgelegt. Der Mutationsort der Mutante NT 1/1 wurde in der Nähe des Genes 3 festgestellt (Abbildung 1). Nicht so leicht zu erklären ist das Defizit an Gen-3-Produkt bei der Transduktionsmutanten NT 12/1 am 13 c₂⁻, da die NT 12/1-Mutation, wie bereits diskutiert wurde, in der Nähe des Genes 1 kartiert wurde. Dies braucht aber nicht zu bedeuten, daß nicht eventuell noch eine weitere Mutation im Bereich des Genes 3 vorliegt, was aus der Proteinauftrennung der Mutante NT 12/1 am 13 c₂⁻ interpretiert werden könnte.

Bei der Mutante HT 12/4 scheint ein direkter Zusammenhang zwischen dem Genprodukt 3 und der veränderten Transduktionshäufigkeit vorzuliegen. Dies kann aus der Tatsache abgeleitet werden, daß dieses Genprodukt bei den Proteinauftrennungen der Rekombinanten RM 15 und RM 18 wieder nachweisbar ist. Diese Rekombinanten wurden aus den DB-Stämmen 122 bzw. 5064 und der Transduktionsmutante HT 12/4 gewonnen und hatten die Transduktionseigenschaft der HT-Phagen verloren. Sie zeigten in bezug auf die Transduktion wieder Wildtyp-eigenschaft. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinextrakte in SDS-Polyacrylamid-Gelen wies keine Unterschiede mehr zum Bandenmuster der K_Larplaquemutante H5 auf.

Während im ersten Teil dieser Arbeit die Identifizierung von Genprodukten des Salmonella-Phagen P22 im Vordergrund stand, sollte im zweiten Abschnitt vor allem untersucht werden, welche Phagen-eigenen Proteine an Salmonella-DNS bzw. an Phagen-DNS binden.

Dazu wurden Proteinextrakte hergestellt und mit DNS inkubiert. Die zugegebene DNS sollte mit bindungsfähigen Proteinen aus einem Extrakt infizierter Zellen einen Komplex bilden, der dann auf Nitrozellulosefiltern haften bleiben sollte.

Bei den in der Literatur beschriebenen Methoden der Filterbindung wird zur Feststellung der Bildung des DNS-Protein-Komplexes als Maß der erfolgten DNS-Bindung durch Proteine die radioaktiv-markierte DNS gemessen (Fehls et al., 1971; Gough et al., 1975; Jessel et al., 1975; Rouvière-Yaniv et al., 1975; Cavalieri et al., 1976; Folkmanis et al., 1976; Schumann et al., 1976).

Im vorliegenden Fall sollten jedoch die möglicherweise gebundenen Proteine identifiziert werden. Daher wurden sie auch mit ^{14}C markiert. Aber sowohl der Background der radioaktiv-markierten ^3H -DNS als auch der der ^{14}C -markierten Proteine auf den Filtern war sehr hoch. Bei den Versuchen, den Background zu senken, stellte sich heraus, daß der Background der DNS um so kleiner war, je größere DNS-Fragmente für den Test verwendet wurden. Bei größeren DNS-Fragmenten ist der prozentuale Anteil von endständigen Einzelstrangstücken, die an die Nitrozellulosefilter binden, verhältnismäßig klein. Der Background der ^{14}C -markierten Proteine konnte durch Vorbehandlung der Filter mit verschiedenen Lösungen stark gesenkt werden (siehe Tabelle 8).

Es wurde beobachtet, daß mehr Bindung von Salmonella-DNS mit Extrakten c_2^- -infizierter Zellen stattfand als mit Extrakten c^+ -infizierter Zellen, obwohl der c_2 -Repressor einen großen Anteil der DNS-bindenden Proteine ausmacht (Gough et al., 1975). Andererseits bindet der c_2 -Repressor spezifisch an Phagen-DNS.

Die vorliegenden Ergebnisse stützen die Untersuchungen von Schumann und Mitarbeitern (1976), die zu dem Schluß kamen, daß die Extrakte von Klarplaque-infizierten Zellen auch zu späten Zeiten noch Bindungsaktivität zeigen, während die Proteinaufarbeitungen von dem Phagen P22 c^+ nur bis ca. 15 min nach Phageninfektion noch die Fähigkeit hatten, Phagen-DNS zu binden.

Die Proteinextrakte, die zu den Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet wurden, waren im Normalfall 30 bis 40 min nach Phageninfektion gewonnen worden. Die Werte der Bindung von Proteinen eines c_2^- -Extraktes an Salmonella-DNS stehen im Gegensatz zu den Werten der Bindung an H5-DNS (Tabelle 6). Vergleicht man die Spalte V mit der Spalte VI, so ist erklärbar, warum in der Spalte VI nur 30 bis 40 % H5-DNS an Protein des Extraktes am 13 c_2^- binden, da, wie schon erwähnt, der c_2 -Repressor bis zu 90 % der Bindungsaktivität ausmachen kann. Vergleicht man aber die Spalten VII und VIII, so ist die Erklärung nicht ganz so einfach. Die Bindung von Proteinen eines Extraktes am 13 c_2^- -infizierter Zellen an Salmonella-DNS ist effektiver als an H5-DNS. Dieses Ergebnis kann praktisch nur so interpretiert werden, daß die Komponenten des Extraktes am 13 c_2^- -infizierter Zellen mehr Proteinbindungsstellen auf der Bakterien-DNS finden als auf der Phagen-DNS. Außerdem kann daraus geschlossen werden, daß die Anwesenheit des c_2 -Repressors

bei Salmonella-DNS keine Rolle spielt, was ein Indiz für die strenge Operatorspezifität dieses Polypeptids ist.

Als die Bedingungen für die Filterbindung optimiert werden sollten, stellte sich heraus, daß diese sehr gut funktionierte, wenn die Extrakte nach der Methode von Echols und Green (1971) gewonnen wurden. Eine 77 %ige Steigerung der Bindungsaktivität konnte erreicht werden, wenn dem Ansatz ATP bis zu einer Endkonzentration von 1,5 mmol/l zugesetzt wurde. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Bindung von Proteinen an DNS - jedenfalls zu späteren Zeiten nach Phageninfektion - Energie benötigt.

Bei dem Versuch, die DNS-Protein-Komplexe vom Filter zu lösen und die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gele zu identifizieren (Abbildung 18), zeigte sich, daß das Genprodukt 9 spezifisch an H5-DNS bindet. Das Genprodukt 9 bildet die "baseplate" oder den Schwanz des Phagenpartikels. Der letzte Schritt in der Phagenmorphogenese besteht in der Anlagerung des Genproduktes 9. Unterbleibt dieser letzte Schritt, so kann der Phage nicht an der Wirtszelle adsorbieren.

Frägt man nach der biologischen Bedeutung einer Affinität zwischen dem Genprodukt 9 und der Phagen-DNS, so könnte diese darin zu finden sein, daß das Bodenplatten-Protein am Ende der "headfull"-Verpackung der DNS möglicherweise den Verschluß darstellt, der einen Verlust der DNS verhindert. Diese Funktion könnte gekoppelt sein mit der Auslösung des Endonukleaseschnittes, der das reife DNS-Molekül vom Konkatermer trennt. Über diese Zusammenhänge ist derzeit noch gar nichts bekannt. Sollte das Genprodukt 9 dabei jedoch eine Rolle spielen - was aufgrund seiner Bedeutung als "Schlußstein" einleuchtend wäre, so fände auch eine Affinität zur Phagen-DNS eine sinnvolle Erklärung. Diese spezifische Bindung des Genproduktes 9 an H5-DNS könnte bedeuten, daß der letzte Schritt der Phagenreifung, das "Assembly" von Kopf und Schwanz, nur dann stattfindet, wenn auf der verpackten DNS eine Bindungsstelle für das Genprodukt 9 vorhanden ist. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, daß Schmieger (1970) und Schmieger und Packhaus (1976) einen Anteil von 10 % Phagen-DNS in den transduzierten bakteriellen DNS-Stücken fanden.

Das Genprodukt 5, das Hauptkopffprotein des Phagenpartikels, bindet in größerer Menge an Salmonella-DNS, jedoch scheint dieser Komplex nicht so spezifisch zu sein, wie der zwischen dem Genprodukt 9 und H5-DNS. Auch sind die Proteine des Salmonella-DNS-Protein-Komplexes leichter zurückzugewinnen als die des H5-DNS-Protein-Komplexes.

Bei dem Unternehmen, zwei auf verschiedene Art gewonnene Extrakte Phagen-infizierter Zellen über SDS-Polyacrylamid-Gele aufzutrennen, konnte lediglich gezeigt werden, daß die Proteinextrakte Unterschiede aufzeigten, die nach den Methoden A bzw. B gewonnen worden waren (Abbildungen 20 und

21). Die aus den SDS-freien Polyacrylamid-Gelen zurückgewonnenen Proteinmengen waren für die Durchführung der Filterbindung zu gering. Es kann aber gesagt werden, daß die Methode E schonender ist als die Methode A (Abbildung 20). Die Abbildung 21 (Methode F) läßt die Interpretation zu, daß während der vorhergehenden SDS-freien elektrophoretischen Auftrennung der Extrakte Phagen-infizierter Zellen Proteine, die in dem Zellmilieu Komplexe bilden (offen ist, ob mit DNS oder Proteinen), als solche gewandert und erst nachdem diese Proteinkomplexe mit dem Detergenz SDS in Berührung kamen, in die einzelnen Komponenten zerfallen sind. Dies wäre auch eine Erklärung dafür, daß mit diesem Extrakt mehr DNS-Protein-Komplexe gebildet wurden als mit dem Extrakt A (Tabelle 10).

Die Auftrennung der Extrakte infizierter Zellen über neutrale Sucrosegradienten zeigt die Abbildung 22. Dieser Gradient wurde dazu benutzt, die Proteine in den Peakfraktionen 1 bis 6 und 30 bis 46 über ein 15 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel zu identifizieren (Abbildung 23). Gewisse Proteine, wie z.B. die Genprodukte 1 und 5 treten in praktisch allen Fraktionen auf, angefangen von den Fraktionen 3, 4 und 5, 6 bis hin zur Fraktion 46. Dies kann daran liegen, daß die Proteine in dem Extrakt zu unterschiedlich großen Aggregaten zusammentreten. In dem Zell-extrakt können sowohl einzelne Proteine vorliegen, als auch schon solche Komplexe, die durch Aggregation Proheads bilden.

Bei der Verteilung des Genproduktes 5 kann es allerdings auch so sein, daß das Genprodukt nur in den Fraktionen 2, 3, 4, 5 und 6 auftritt. In den späteren Fraktionen könnte ein bisher noch nicht identifiziertes Protein auftreten. Bei elektrophoretischen Auftrennungen von Extrakten am 5-infizierter Zellen tritt häufig ein Protein in Erscheinung, welches in geringerer Menge als das Genprodukt 5 vorkommt, aber ein ähnliches Molekulargewicht aufweist (Abbildung 10). Da dieses Protein in normalen Auftrennungen von Extrakten infizierter Zellen vom Gen-5-Produkt überlagert wird, konnte dieses Protein bis jetzt noch nicht identifiziert werden.

Bei der Auftrennung der Proteinextrakte über eine Sephadex G-100 Säule kann das Genprodukt 5 in den Fraktionen 11 und 12 identifiziert werden (Abbildung 25), in den Bindungstests (Abbildung 24) kann in diesen Fraktionen keine Bindung an H5-DNS festgestellt werden und nur wenig Bindung an Salmonella-DNS. Dies stimmt mit den in Abbildung 18 wiedergegebenen Ergebnissen überein. Dem Genprodukt 5, dem Hauptkopfprotein, konnte keine Bindungsfähigkeit an H5-DNS nachgewiesen werden. Auch die Bindung an Salmonella-DNS erscheint nicht logisch, da bei transduzierenden Partikeln die DNS auch wieder den Phagenkopf verläßt und dieser Vorgang Schwierigkeiten mit sich bringen muß, wenn die DNS mit dem Protein eine Bindung eingehen würde.

Die Auftrennung über DEAE-Zellulose zeigt eine gute

Auftrennung der Proteine (Abbildung 26). Die Bindungstests hingegen zeigten, daß praktisch alle Fraktionen an Salmonella-DNS binden, während die Bindung der einzelnen Fraktionen an H5-DNS Unterschiede feststellen läßt. Von diesen Fraktionen bindet nur ca. die Hälfte gut an H5-DNS. Auch hier muß wieder auf Abbildung 18 verwiesen werden, die deutlich zeigt, daß das Genprodukt 5 in größerer Menge an Salmonella-DNS bindet als an H5-DNS, wenn diese Bindung des Salmonella-DNS-Protein-Komplexes auch leichter zu lösen zu sein scheint. Da die Autoradiographien der SDS-Polyacrylamid-Gele dieser Proteinauftrennung zeigen (Abbildung 27), daß in allen Fraktionen das Genprodukt 5 vorkommt, bzw. ein Protein von ähnlichem Molekulargewicht, ist es leicht vorstellbar, daß die Bindung fast jeder Fraktion mit Salmonella-DNS durch das Genprodukt 5 bedingt ist. Es ist aber nicht auszuschließen, daß diese Bindung von dem Protein mit ähnlichem Molekulargewicht wie das Genprodukt 5 verursacht wurde.

Das Genprodukt 5 konnte vor allem bei niedrigen Salzkonzentrationen in größerer Menge eluiert werden. Bei höheren Salzkonzentrationen tritt ein Protein mit einem ähnlichen Molekulargewicht wie das Genprodukt 5 in Erscheinung. Ebenso taucht in fast allen Fraktionen das Genprodukt 9 auf, und zwar ziemlich stark bei Salzkonzentrationen von 0,14 bis 0,21 mol/l KCl und in dem Konzentrationsbereich von 0,755 bis 1,0 mol/l KCl (Abbildung 26). Auf der Abbildung 27 ist zu erkennen, daß in den Fraktionen, in denen viel Genprodukt 5 und 9 auftaucht, auch das Genprodukt 8 nachweisbar ist. Eine Bindung von H5-DNS an Proteine der dialysierten Eluate ist dort zu finden, wo die Genprodukte 1, 9, 5 und 8 nachweisbar sind (die Fraktionen 17, 19, 20, 27 bis 31), oder wo das Genprodukt 1 stark auftritt und sowohl etwas Genprodukt 9 als auch 5 (in den Fraktionen 39, 41 bis 45 und 52) vorhanden ist. Die Genprodukte 9 und 5 sind als Banden auf der Autoradiographie erkennbar, wo noch weitere Fraktionen an H5-DNS binden (Fraktion 64 bis 68, 71, 74 bis 81). In diesen letzten Fällen scheint aber das Genprodukt 9 eindeutig für die Bindungsaktivität der Fraktionen an die H5-DNS verantwortlich zu sein.

E) ZUSAMMENFASSUNG

=====

- (1) Das geeignete Minimalmedium für den Salmonella-Stamm 4010 war das Medium M9-III. Es erlaubte sowohl das Zellwachstum als auch die Ausbildung von Adsorptionsstellen für den Phagen P22. Nach UV-Bestrahlung der Bakterienzellen mit 2.100 erg/mm^2 stellten die Bakterien ihr Wachstum ein, die bakterielle Proteinsynthese war unterbunden, die zugegebenen Phagen konnten aber trotzdem adsorbieren, injizieren und ihre eigene Proteinsynthese in Gang setzen.
- (2) Die von Laemmli (1970) und Studier (1973) beschriebene Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lieferte bei Proteinauftrennungen scharfe Bänder und wurde zur Identifizierung von Genprodukten benutzt. Getrocknet wurden diese Gele nach einer modifizierten Methode von Fairbanks (1965).
- (3) Die Belichtungszeit der Röntgenfilme durch radioaktiv-markierte Proteine in Gelen wurde durch die Methode von Ponner und Laskey (1974) verkürzt. Der Belichtungszeitraum konnte durch die Einführung von dimethyl-POPOP noch weiter eingeschränkt werden.
- (4) Das Molekulargewicht des Genproduktes 19 (20.000 d nach Susskind u. Botstein, 1978) konnte durch SDS-Polyacrylamid-Gele gestützt werden. Es scheint das Genprodukt 13 identifiziert zu sein und sein Molekulargewicht wurde mit 38.000 d bestimmt. Den Genprodukten 2 und 16 wurden neue Molekulargewichte zugeordnet. Die in der Literatur (Susskind und Botstein, 1978) angegebenen Werte wurden in folgender Weise korrigiert: dem Genprodukt 2 wurde ein Molekulargewicht von 67.000 d zugeordnet und dem Genprodukt 16 ein Molekulargewicht von 63.000 d.
- (5) An den beiden am 16-Mutanten Nr.34 und Nr.39 konnte gezeigt werden, daß 15 min nach Phageninfektion noch keine Genprodukte 1, 9 und 2 gebildet werden. Diese fehlenden oder nur in geringer Menge vorkommenden Proteine erscheinen dann nach 30 min in größerer Menge und 45 min nach Phageninfektion liegen sie in der Endkonzentration vor. Die Mutante Nr. 39 zeigt eine Ausnahme: bis zu 30 min nach Phageninfektion ist ein Protein vom Molekulargewicht 90.000 d nachweisbar. Solange dieses Protein im Gel erscheint, taucht kein Genprodukt 2 auf. Nach 45 min verschwindet das Protein vom Molekulargewicht 90.000 d völlig und das Genprodukt 2 erscheint in gleicher Menge wie zuvor dieses Protein. Möglicherweise ist dieses Protein eine Vorläuferstruktur des Genproduktes 2.
- (6) Die Background-Bindung radioaktiv-markierter Proteine

konnte durch die Behandlung der Filter mit $1/10$ mol/l Tris-HCl pH 7,4 -Lösung, der 1 % Pyrophosphat zugesetzt war, gesenkt werden.

- (7) c_2^- -Proteinextrakte binden in größerer Menge an Salmonella-DNS als c^+ -Proteinextrakte, während c^+ -Proteinextrakte in größerer Menge mit H5-DNS einen Komplex eingehen.
- (8) Eine 77 %ige Steigerung der Bindungsaktivität konnte gezeigt werden, wenn dem Ansatz ATP zugesetzt wurde.
- (9) Das Genprodukt 9 bindet sehr spezifisch an H5-DNS, während das Genprodukt 5 mehr Bindungskomplexe mit Salmonella-DNS bildet, die aber leichter wieder zu lösen sind.

F) LITERATURVERZEICHNIS

=====

- Alberts, F.; Herrick, G.
DNA-Cellulose Chromatography
Methods in Enzymology, Ed. XXI (1971)
- Bachrach, U.; Fenchetrit, L.
Studies on Phage Internal Proteins
III. Specific Binding of T4 Internal Proteins to T4 DNA
Virology 59, 443 - 454 (1974)
- Bachhaus, H.; Schmieger, H.
The origin of the DNA in a special class of Generalized
Transducing Particles of Salmonella-Phage P22
Molec. gen. Genet. 131, 123 - 135 (1974)
- Bachhaus, H.
Untersuchungen zur Phagen-kontrollierten Synthese der
bakteriellen DNS in transduzierenden Partikeln des
Salmonella-Phagen P22.
Dissertation an der LMU München (1976)
- Bollum, F. J.
Mammalian DNA Polymerases
Progr. in Nucl. Acid Res. a. Molec. Biol. 15, 109-144
(1975)
- Fonner, W. M.; Laskey, R. A.
A Film Detection Method for Tritium-Labelled Proteins
and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels.
Eur. J. Biochem. 46, 83 - 88 (1974)
- Botstein, D.; Waddell, C. H.; King, J.
Mechanism of Head Assembly and DNA Encapsulation in
Salmonella Phage P22.
I. Genes, Proteins, Structures and DNA Maturation
J. Mol. Biol. 80, 669 - 695 (1973)
- Brody, T.
A DNA-Binding Form of the Main Structural Protein of
Lambda Heads
Virology 54, 441 - 451 (1973)
- Buch, U.
Die Fragmentierung der DNS von Salmonella typhimurium
nach Infektion durch den Phagen P22 bei der Bildung
transduzierender Partikel.
Diplomarbeit an der LMU München (1974)
- Purgi, E.; Hershey, D.
Sedimentation rate as a measure of molecular weight of
DNA.
Biophysical Journal 3, 309 - 321 (1963)

- Casjens, S.; King, J.
P22 Morphogenesis I: Catalytic Scaffolding Protein in
Capsid Assembly
J. of Supr. Struc. 2, 202 - 224 (1974)
- Cavalieri, S. J.; Neet, K. F.; Goldthwait, D. A.
Gene 5 Protein of Bacteriophage ϕ d: A Dimer which
Interacts Co-operatively with DNA
J. Mol. Biol. 102, 697 - 711 (1976)
- Crick, F. H. C.;
Codon-Anticodon pairing: The Wobble hypothesis.
J. Mol. Biol. 19, 548 - 555 (1966)
- Echols, H.; Green, L.
Establishment and Maintenance of Repression by
Bacteriophage Lambda: The Role of cI, cII and cIII
Proteins.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 68, 2190 - 2194 (1971)
- Esche, H.; Schweiger, M.; Trautner, T. A.
Gene Expression of Bacteriophage SPP1
I. Phage Directed Protein Synthesis
Molec. gen. Genet. 142, 45 - 55 (1975)
- Fairbanks, G.; Levinthal, C.; Reeder, R. H.
Maizel's Modification (Methods in Virology, Vol V,
edited by Maramorosch and Kaprowski, Academic Press) of
procedures.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 393 - 399 (1965)
- Folkmanis, A.; Takeda, Y.; Simuth, J.; Gussin, G.;
Echols, H.
Purification and properties of a DNA-binding protein
with characteristics expected for Cro protein of
bacteriophage λ , a repressor essential for lytic
growth.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 73, 2249 - 2253 (1976)
- Gilbert, W.; Dressler, D.
DNA-replication: The rolling circle model.
Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 33, 473 - 484 (1968)
- Gough, M.; Tokuno, S.
Further Structural und Functional Analogies between the
Repressor Region of Phage P22 and .
Molec. gen. Genet. 138, 71 - 79 (1975)
- Hafeti, Y.; Hanstein, W. G.
Destabilization of Membranes with Chaotropic Ions.
Methods in Enzymology, Vol. XXXI (1974)

Hershey, A. D.; Dixon, J.; Chase, M.
Nucleic acid economy in bacteria infected with
bacteriophage T2.
I. Purine and pyrimidine composition.
J. gen. Physiol. 36, 777 - 789 (1953)

Hohn, B.; Wurtz, M.; Klein, B.; Lustig, A.; Hohn, T.
Phage Lambda DNA Packaging, in vitro.
J. Supr. Struc. 2, 302 - 317 (1974)

Holmes, A. M.; Johnston, J. R.
DNA Polymerases of Eukaryotes
FEBS Letters 60, 233 - 243 (1975)

Jackson, E. N.; Miller, H. J.; Adams, J. L.
Eco RI Restriction Endonuclease Cleavage
Site Map of Bacteriophage P22 DNA
J. Mol. Biol. 118, 347 - 363 (1978)

Jackson, E. N.; Jackson, D. A.; Deans, R. J.
Eco RI analysis of bacteriophage P22 DNA packaging.
J. Mol. Biol. 118, 365 - 388 (1978)

Jessel, D.; Hudson, J.; Landau, T.; Tenen, D.;
Livingston, M.
Interaction of Partially Purified Simian Virus 40 T
Antigen with circular Viral DNA Molecules
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72, 1960 - 1964 (1975)

Joester, W.; Joester, K.-E.; van Dorp, R.;
Hofschneider, P. H.
Purification and Properties of DNA-dependent
DNA-polymerases from *Neurospora crassa*.
Nucleic Acids Research 5, 3043 - 3056 (1978)

King, J.; Lenk, F. V.; Potstein, D.
Mechanism of Head Assembly and DNA Encapsulation in
Salmonella Phage P22
II. Morphogenetic Pathway
J. Mol. Biol. 80, 697 - 731 (1973)

Kreutinger, R.
Untersuchungen und Vergleich zweier Zellaufschlußver-
fahren für *Salmonella typhimurium*
Diplomarbeit an der LMU München (1976)

Laemmli, U. K.
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of
the Head of Bacteriophage T4.
Nature 227, 680 - 685 (1970)

Levine, M.
Replication and Lysogeny with Phage P22 in *Salmonella*
typhimurium
Curr. Top. in Microbiol. and Immunol. 58,
135 - 156 (1972)

- Levine, M.; Smith, H. O.
Sequential gene action in the establishment of lysogeny
Science 146, 1581 - 1582 (1964)
- Lewis, E. J.; Abrell, J. W.; Smith, R. G.; Gallo, R. C.
Human DNA Polymerase III (R-DNA Polymerase):
Distinction from Polymerase I and Reverse Transcriptase
Science 183, 867 - 869 (1974)
- Lew, K.; Casjens, S.
Identification of Early Proteins Coded by Bacteriophage
P22
Virology 68, 525 - 533 (1975)
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall,
R. J.
Protein measurement with Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)
- Oppenheim, A. B.; Katzir, N.; Oppenheim, A.
Regulation of Protein Synthesis in Bacteriophage :
Restoration for Gene Expression in λ N⁻ Strains by
Mutations in the Cro Gene.
Virology 79, 405 - 425 (1977)
- Raj, A. A.; Raj, A. Y.; Schmieger, H.
Phage genes involved in the formation of generalized
transducing particles in Salmonella phage P22.
Molec. gen. Genet. 135, 175 - 184 (1974)
- Rhoades, M.; MacHattie, L. A.; Thomas, C. A. jr.
The P22 bacteriophage DNA molecule.
I. The mature form.
J. Mol. Biol. 37, 21 - 40 (1968)
- Rouvière-Yaniv, J.; Gros, E.
Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-
binding protein from Escherichia coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72, 3428 - 3432 (1975)
- Schmieger, H.
Die molekulare Struktur transduzierender Partikel beim
Salmonella-Phagen P22.
I) Dichtegradienten-Untersuchungen an intakten Phagen
Molec. gen. Genet. 102, 336 - 347 (1968)
- Schmieger, H.
The molecular structure of the transducing particles of
Salmonella phage P22.
II) Density gradient analysis of DNA
Molec. gen. Genet. 109, 323 - 337 (1970)
- Schmieger, H.
The fate of the bacterial chromosome in P22-infected
cells of Salmonella typhimurium.
Molec. gen. Genet. 110, 238 - 244 (1971)

- Schmieger, H.
A Method for Detection of Phage Mutants with Altered Transducing Ability.
Molec. gen. Genet. 110, 378 - 381 (1971)
- Schmieger, H.
Phage P22-Mutants with Increased or Decreased Transduction Abilities.
Molec. gen. Genet. 119, 75 - 88 (1972)
- Schmieger, H.; Eackhaus, H.
Altered Cotransduction Frequencies Exhibited by HT-Mutants of Salmonella-Phage P22.
Molec. gen. Genet. 143, 307 - 309 (1976)
- Schmieger, H.; Euch, U.
Appearance of transducing particles and the fate of host DNA after infection of Salmonella typhimurium with P22-mutants with increased transducing ability (HT-mutants).
Molec. gen. Genet. 140, 111 - 122 (1975)
- Schumann, W.; Lindenblatt, E.; Bade, E.G.
Phage specific DNA-binding proteins in P22-lysogenic and in P22-infected Salmonella typhimurium.
J. of Virology 20, 334 - 338 (1976)
- Segrest, J.P.; Jackson, R.L.
Molecular Weight Determination of Glycoproteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate.
Methods in Enzymology, Vol. XXVIII, 54 - 63 (1972)
- Smith, H.O.
Defective phage formation by lysogens of integration deficient phage P22 mutants.
Virology 34, 203 - 223 (1968)
- Smith, H.O.; Levine, M.
Two sequential repressions of DNA synthesis in the establishment of lysogeny by phage P22 and its mutants.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 52, 356 - 363 (1964)
- Söll, D.; Cherayil, J.D.; Rock, R.M.
Studies on polynucleotides.
LXXV. Specificity of tRNA for codon recognition as studied by the ribosomal binding technique.
J. Mol. Biol. 29, 97 - 112 (1967)
- Susskind, M.M.; Botstein, D.
Molecular Genetics of Bacteriophage P22.
Microbiol. Reviews 42, 385 - 413 (1978)

- Starlinger, P.
Zur Herkunft des in der Transduktion durch den Phagen
P22 Übertragenen Materials.
Zeitschrift f. Naturforschung 14b, 523 - 528 (1959)
- Stegemann, H.
Vertikale Platten-Elektrophorese, waagerechte
Platten-Fokussierung.
Arbeitsanweisung zur Apparatur (1968)
- Strätling, W.; Krause, E.; Knippers, R.
Fast sedimenting deoxyribonucleic acid in bacteriophage
T7-infected cells.
Virology 51, 109 - 119 (1973)
- Streisinger, G.; Emrich, J.; Stahl, M.
Chromosome structure in phage T4. Terminal redundancy
and length determination.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 57, 292 - 295 (1967)
- Strobel, E.; Schmieger, H.
In vitro Packaging of Exogenous DNA by Salmonella Phage
P22.
J. gen. Virol. 45, 291 - 299 (1979)
- Studier, F.W.
Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on
slab gels.
J. Mol. Biol. 79, 237 - 248 (1973)
- Tye, B.-K.; Chan, R.K.; Botstein, D.
Packaging of an oversize transducing genome by
Salmonella phage P22.
J. Mol. Biol. 85, 485 - 500 (1974)
- Tye, B.-K.; Hubermann, J.A.; Botstein, D.
Non-random circular permutation of phage P22 DNA.
J. Mol. Biol. 85, 501 - 527 (1974)
- Weaver, S.; Levine, M.
Replication in situ and DNA encapsulation following
induction of an excision-defective lysogen of
Salmonella bacteriophage P22.
J. Mol. Biol. 118, 389 - 411 (1978)
- Weber, K.; Osborn, M.
The Reliability of Molecular Weight Determinations by
Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
J. Biol. Chemistry 244, 4406 - 4412 (1969)
- Weber, K.; Pringle, J.R.; Osborn, M.
Measurement of Molecular Weights by Electrophoresis on
SDS-Acrylamide Gel.
Methods in Enzymology, Vol. XXVI, 3 - 27 (1972)

Weissbach, A.
Vertebrate DNA Polymerases.
Cell 5, 101 - 108 (1975)

Weissbach, A.
Eukaryotic DNA Polymerases.
Ann. Rev. Biochem. 46, 25 - 47 (1977)

Yates, J.L.; Gette, W.R.; Furth, W.E.; Momura, M.
Effects of ribosomal mutations on the read-through of a
chain termination signal: Studies on the synthesis of
bacteriophage λ O gene protein in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 74, 689 - 693 (1977)

Zinder, N.D.; Lederberg, J.
Genetic exchange in Salmonella.
J. Bacteriol. 64, 679 - 699 (1952)

L E B E N S L A U F

=====

Am 23.4.1944 wurde ich als zweites Kind des Medizinalrates Dr. med. Eugen Buch und seiner Ehefrau Regina, geb. Jacobs, in Litzmannstadt geboren. Im Januar 1945 siedelten wir nach Witterda bei Erfurt über. Am 1. September 1950 wurde ich in die dortige achtklassige Grundschule eingeschult, die ich bis zum 21.3.1957 besuchte, da meine Eltern aus politischen Gründen die DDR verlassen mußten.

Ostern 1957 wurde ich in das Neusprachliche Mädchengymnasium in Dinslaken eingeschrieben. Dort beendete ich meine Schulausbildung am 7.2.1966 mit dem Abitur.

Am 13.4.1966 immatrikulierte ich mich an der westfälischen Wilhelms-Universität in Münster für das Studium der Naturwissenschaften. Zum Wintersemester 1967/68 wechselte ich an die Ludwig-Maximilians-Universität in München. Am 30. Oktober 1974 beendete ich mein Studium mit dem Diplom in Biologie und begann am 1.11.1974 meine Promotionsarbeit am Genetischen Institut der Universität München.

Seit dem 1. April 1980 bin ich mit dem Diplom-Biologen Gerhard Stauder verheiratet.

